



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BÁRBARA BELCHIOR BEZERRA**

**PROTEÍNAS EXPRESSAS DURANTE A ONTOGENIA DO BOTÃO FLORAL DE  
ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)**

**CAMPINA GRANDE – PB  
2019**

**BÁRBARA BELCHIOR BEZERRA**

**PROTEÍNAS EXPRESSAS DURANTE A ONTOGENIA DO BOTÃO FLORAL DE  
ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liziane Maria de Lima**

**CAMPINA GRANDE – PB  
2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

B574p Bezerra, Bárbara Belchior.  
Proteínas expressas durante a ontogenia do botão floral de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) [manuscrito] / Bárbara Belchior Bezerra. - 2019.  
62 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2019.  
"Orientação : Profa. Dra. Liziane Maria de Lima, Embrapa Algodão."  
1. Cultivo de algodão. 2. Melhoramento de plantas. 3. Proteômica. 4. Espectrometria de massa. I. Título  
21. ed. CDD 633.51

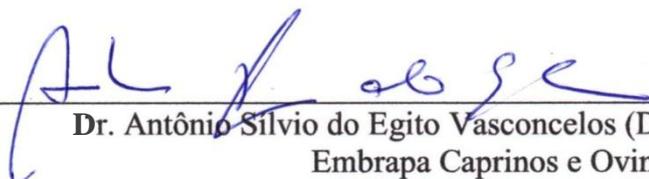
**BÁRBARA BELCHIOR BEZERRA**

**PROTEÍNAS EXPRESSAS DURANTE A ONTOGENIA DO BOTÃO FLORAL DE  
ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)**

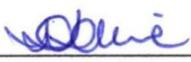
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2019

**BANCA EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Antônio Sílvio do Egito Vasconcelos (D. Sc., Bioquímica)  
Embrapa Caprinos e Ovinos

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Roseane Cavalcanti dos Santos (D. Sc., Biologia Molecular)  
Embrapa Algodão

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Liziane Maria de Lima (D. Sc., Biologia Molecular)  
Embrapa Algodão  
(Orientadora)

*In memoriam*

Ao meu avô Valdemar Belchior da Silva, homem  
íntegro e de uma alegria contagiante.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos.

A minha mãe, Angela de Maria Silva, mulher guerreira, de fibra, que tanto me orgulha. Quero me espelhar na sua competência profissional e na mulher que és.

Ao meu irmão, Bruno Belchior Bezerra, que me serve de exemplo, pela força de vontade, perseverança e profissionalismo, e por ter me dado o maior presente da minha vida, meus sobrinhos amados.

Ao meu esposo, meu amigo, companheiro de vida, que tanto amo, Thiago Emmanuel de Carvalho, pela paciência e dedicação diária.

A todos os meus familiares, os quais não tenho como citar nome por nome, pelas boas vibrações.

A minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Liziane Maria de Lima, por não ter desistido de mim, pela paciência e principalmente pela compreensão dedicada.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, Vandrê Guevara, Carliane Rebeca, Daniela Duarte, Aline Dayanna, Sabrina Kelly, Luana Camilla, Fátima Caetano, Allef Barbosa, Marília Morais, Jean Pierre, Wellison Dutra, Matheus Santos, Gércia Gonçalves pela companhia diária, ensinamentos e momentos de descontração em meio as dificuldades.

A todos do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, em especial a Geisenilma Maria pela estadia e principalmente por todo o apoio ao longo do trabalho e ao Prof. Tercílio Calsa pela oportunidade de trabalhar na sua equipe.

As técnicas Fábria Suely e Terezinha Duarte pela paciência e palavras de apoio.

Aos companheiros da turma 2017 do Mestrado em Ciências Agrárias da UEPB, em especial Kathyane Maciel e Renato Jales por terem tornado a caminhada mais leve e divertida.

As minhas amigas, tão queridas, que sempre se fazem presentes mesmo ausentes. As do colégio, da faculdade, da minha amada Monteiro, as da vida.

À Embrapa Algodão, a CAPES, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (PPGCA) da UEPB e a todos os professores.

Ao CETENE.

A minha banca examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Roseane Cavalcanti dos Santos e Dr. Antônio Sílvio do Egito Vasconcelos, por ter aceitado participar desse importante momento e principalmente pelas contribuições dadas no decorrer do trabalho. O meu imenso respeito pelos excelentes profissionais que são.

A todos que contribuíram de alguma forma para essa conquista, meu muito  
OBRIGADA!

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais eventos biológicos relacionados aos estádios de desenvolvimento do botão floral do algodoeiro.....	19
<b>Tabela 2.</b> Quantificação de proteínas de botões florais pelo método de Bradford baseada nos métodos TCA e TCA/Fenol.....	30
<b>Tabela 3.</b> Quantificação pelo método de Bradford das proteínas totais dos diferentes tamanhos de botões florais (2 a 20 mm) de algodoeiro.....	32
<b>Tabela 4.</b> Anotação presumida das proteínas caracterizadas e identificadas em botão floral de 2 mm de acordo com os scores de similaridade encontrados após análise no programa Mascot ( $p \leq 0,05$ ).....	35
<b>Tabela 5.</b> Anotação presumida das proteínas caracterizadas e identificadas em botão floral de 12 mm de acordo com os scores de similaridade encontrados após análise no programa Mascot ( $p \leq 0,05$ ).....	37
<b>Tabela 6.</b> Anotação presumida das proteínas caracterizadas e identificadas em botão floral de 20 mm de acordo com os scores de similaridade encontrados após análise no programa Mascot ( $p \leq 0,05$ ).....	39
<b>Tabela 7.</b> Proteínas significativas identificadas em botão floral de algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento.....	44

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comportamento da área cultivada com algodão no Brasil ao longo de 16 anos.	16
<b>Figura 2.</b> Mapa da produção de algodão no Brasil.....	16
<b>Figura 3.</b> Secção longitudinal da flor do algodoeiro.....	18
<b>Figura 4.</b> Ilustração dos processos que ocorrem durante a técnica MALDI-TOF.....	24
<b>Figura 5.</b> Eletroforese em SDS-PAGE (12%) de proteínas totais extraídas de botões florais de algodoeiro através de diferentes métodos de extração. A coloração do gel foi realizada com azul de <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> . MM- Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (KDa); 10, 12, 14 - Tamanho dos botões florais (mm); TF - extração pelo método TCA/fenol; T - extração pelo método TCA.....	31
<b>Figura 6.</b> Identificação das bandas escolhidas com diferentes pesos moleculares para análise via espectrometria de massas. MM- Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (KDa); 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20- Tamanho dos botões florais (mm).....	33
<b>Figura 7.</b> Distribuição das proteínas caracterizadas e identificadas nos diferentes tamanhos de botões florais. (A) Botão floral de 2 mm; (B) Botão floral de 12 mm e (C) Botão floral de 20 mm.....	41
<b>Figura 8.</b> Categorização das proteínas identificadas no botão floral de 2 mm via Gene Ontology.....	42
<b>Figura 9.</b> Categorização das proteínas identificadas no botão floral de 12 mm via Gene Ontology.....	42
<b>Figura 10.</b> Categorização das proteínas identificadas no botão floral de 20 mm via Gene Ontology.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 1D – Unidimensional
- 2D – Eletroforese Bidimensional
- 2ME - 2-mercaptoetanol
- ATP – Trifosfato de adenosina
- DTT – Ditiotreitól
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- ESI – Ionização por eletrodispersão
- IAA – Iodoacetamida
- IT - Aprisionamento de íons
- KCl – Cloreto de Potássio
- LC – Cromatografia líquida
- mA – Miliampere
- MALDI – Dessorção/Ionização de Matriz Assistida por Laser
- MS – Espectrometria de massas
- PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
- PCM - Células-mãe do pólen
- PMF - *Peptide mass fingerprint*
- PMSF – Fenilmetilsulfonilfluoreto
- PVPP – Polivinilpolipirrolidone
- Q – Quadrupolo
- rpm – Rotações por minuto
- SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
- SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
- TCA – Ácido tricloroacético
- TFA – Ácido trifluoroacético
- TOF - Tempo de voo
- TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

## RESUMO

O algodoeiro é considerado uma das principais *commodities* mundial. No cenário nacional, devido ao seu valor econômico e social, o algodão ocupa lugar de destaque como uma das mais importantes culturas produzidas no país. O gênero *Gossypium* apresenta aspectos únicos quanto a reprodução e por esse motivo atrai o interesse científico. Estudos relacionados a identificação de proteínas presentes na estrutura reprodutiva do algodoeiro e os respectivos genes podem auxiliar o melhoramento de plantas para obtenção de cultivares com resistência a insetos. Neste trabalho, objetivou-se investigar as proteínas expressas no botão floral do algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento. Para estabelecer a melhor metodologia de extração de proteínas foram testados dois protocolos: TCA e TCA associado ao método fenol (TCA/Fenol), sendo o segundo o que ofereceu melhor resultado, motivo pelo qual foi escolhido para as análises. As proteínas extraídas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). As diferentes fases de desenvolvimento do botão floral (2 a 20 mm) apresentaram perfil proteico semelhante, mas com algumas bandas diferencialmente acumuladas. Um total de 34 bandas provenientes da eletroforese de botões florais com 2, 12 e 20 mm foram excisadas para análise por espectrometria de massas em AutoFlex III ToF/ToF, através de MALDI-TOF MS. Os espectros de massas obtidos foram analisados na base de dados MASCOT que permitiu a identificação de 241 proteínas acumuladas em botão floral de algodoeiro, 132 destas caracterizadas e com papéis celulares claros, contudo apenas seis apresentaram score significativo quando comparadas com os bancos de dados, são elas: ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial; Fator de transcrição RADIALIS; Proteína F-box associada a FBD At5g56380; Proteína semelhante ao Retículo; Proteína portadora de acilo 2, mitocondrial; e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. A partir destes resultados é possível inferir aspectos funcionais do proteoma de botão floral de algodoeiro, bem como sua associação com fatores fisiológicos e metabólicos.

**Palavras-chave:** Órgão reprodutivo; Proteômica; Espectrometria de massa; Sequenciamento de peptídeos

## ABSTRACT

Cotton is considered one of the main commodities worldwide. In the national scenario, due to its economic and social value, cotton occupies a prominent position as one of the most important crops produced in the country. The genus *Gossypium* presents unique aspects as to its reproduction and for that reason it attracts the scientific interest. Studies related to the identification of proteins present in the reproductive structure of the cotton plant and their respective genes can help the improvement of plants to obtain cultivars with resistance to insects. In this work, the objective was to investigate the proteins expressed in the floral bud of cotton in different stages of development. In order to establish the best methodology for protein extraction, two protocols were tested: TCA and TCA associated with the phenol method (TCA / Phenol). The second one was the best one, and was chosen for the analysis. The extracted proteins were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The different phases of development of the floral bud (2 to 20 mm) presented similar protein profile, but with some differentially accumulated bands. A total of 34 bands from 2, 12 and 20 mm floral bud electrophoresis were excised for analysis by mass spectrometry in AutoFlex III ToF / ToF, using MALDI-TOF MS. The mass spectra obtained were analyzed in the MASCOT database, which allowed the identification of 241 proteins accumulated in floral bud of cotton, 132 of these characterized and with clear cellular papers, however only six presented a significant score when compared with the databases, are they: ATP synthase alpha subunit, mitochondrial; Transcription factor RADIALIS; Protein F-box associated with FBD At5g56380; Reticulum-like protein; Acyl carrier protein 2, mitochondrial; and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. From these results it is possible to infer functional aspects of the floral bud of cotton, as well as its association with physiological and metabolic factors.

**Key words:** Reproductive organ; Proteomics; Mass spectrometry; Peptide Sequencing

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1 Objetivo geral</b> .....	13
<b>1.2 Objetivos específicos</b> .....	13
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1 Aspectos gerais da cultura do algodão e potencial econômico</b> .....	14
<b>2.2 Anatomia da flor do algodoeiro e reprodução</b> .....	16
<b>2.3 Expressão gênica</b> .....	18
<b>2.4 Proteômica do algodão</b> .....	19
2.4.1 Ferramentas disponíveis para o estudo de proteômica .....	21
2.4.2 Espectrometria de massas e identificação dos peptídeos .....	23
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	25
<b>3.1 Cultivo de plantas e coleta de material vegetal</b> .....	25
<b>3.2 Extração de proteínas totais</b> .....	25
<b>3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (1DE)</b> .....	26
<b>3.4 Tripsinização</b> .....	27
<b>3.5 Espectrometria de massa e sequenciamento de peptídeos</b> .....	27
<b>3.6 Identificação de peptídeos</b> .....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>4.1 Extração e quantificação de proteínas</b> .....	29
<b>4.2 Eletroforese Unidimensional (1DE) e análise das proteínas</b> .....	30
<b>4.5 Análise das proteínas significativas</b> .....	45
4.5.1 ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial .....	45
4.5.2 Fator de transcrição RADIALIS .....	46
4.5.3 Proteína F-box associada a FBD At5g56380 .....	46
4.5.4 Proteína semelhante ao retículo .....	47
4.5.5 Proteína portadora de acilo 2, mitocondrial .....	47
4.5.6 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase .....	48
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma cultura produzida em mais de 60 países, com uma média de 35 milhões de hectares cultivados anualmente. Em termos financeiros, o comércio mundial de algodão movimentava aproximadamente US\$ 12 bilhões por ano, gerando emprego direto e indiretamente a mais de 350 milhões de pessoas envolvidas nos processos de colheita, descaroçamento, processamento e embalagem (ABRAPA, 2018a).

No cenário nacional, devido ao seu valor econômico e social, o algodão ocupa lugar de destaque como uma das mais importantes culturas produzidas no país. O Brasil é considerado o terceiro maior exportador de algodão do mundo, com uma estimativa de produção de 2.363,8 mil toneladas de pluma para a safra 2018/19 (CONAB, 2018).

Há grande mobilização da cadeia produtiva em torno de estratégias para tornar a cotonicultura ainda mais competitiva, principalmente via redução de custos de produção, especialmente no controle de pragas e doenças. Com o advento da transgenia foram desenvolvidas lavouras geneticamente modificadas (GM), alavancando ainda mais o cultivo do algodão no mundo. O Brasil é o segundo maior produtor deste tipo de lavouras, detendo cerca de 80% de todo algodão cultivado é geneticamente modificado (ISAAA, 2017).

O gênero *Gossypium* apresenta aspectos únicos quanto a reprodução e por esse motivo atrai o interesse científico. Diversos estudos foram desenvolvidos para identificação e expressão de genes, que respondeu por importantes processos, tanto na fase vegetativa como na reprodutiva (BERG et al., 2005; NAQPAL et al., 2005; PINHEIRO et al., 2013; BATISTA et al., 2015). Tais estudos possibilitam o conhecimento acerca de vários produtos, tais como síntese de hormônios e identificação de novas proteínas, o que é de suma importância para trabalhos de expressão e regulação gênica.

As ciências conhecidas como ômicas surgiram como ferramentas moleculares para auxiliar nesses estudos, aumentando consideravelmente a quantidade de informações na literatura sobre os produtos gênicos. Dentre essas ciências destaca-se a proteômica que fornece informações importantes acerca dos processos bioquímicos pela verificação das proteínas que desempenham funções enzimáticas, de sinalização e de regulação codificadas pelo genoma e transcriptoma (QURESHI et al., 2007). Avanços tecnológicos vêm permitindo o aumento da cobertura do proteoma de plantas de interesse comercial (VANDERSCHUREN et al., 2013).

A proteômica não se baseia apenas na determinação do conjunto de proteínas presentes em uma amostra, permite também a análise do estado fisiológico da planta, de processos específicos, bem como a avaliação das respostas a fatores bióticos e abióticos (CELLINI et al., 2004; VALDES et al., 2013).

Embora a cultura do algodão tenha obtido um grande avanço tecnológico, estudos relacionados a identificação de proteínas presentes na estrutura reprodutiva do algodoeiro são necessários, porque podem auxiliar em trabalhos de seleção assistida no melhoramento de plantas focalizando em processos relacionados com a precocidade ou ainda na defesa de plantas contra estresses bióticos e abióticos que afetam a fenologia e rendimento da cultura.

### **1.1 Objetivo geral**

Investigar as proteínas expressas no botão floral do algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento e em diferentes fases fenológicas da planta.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Estabelecer a melhor metodologia de extração das proteínas de botão floral de algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento (2 a 20 mm);
- Analisar as proteínas extraídas de botão floral do algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento (2 a 20 mm) utilizando SDS-PAGE;
- Isolar as proteínas diferenciais e identificá-las via espectrometria de massa e análises *in silico*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

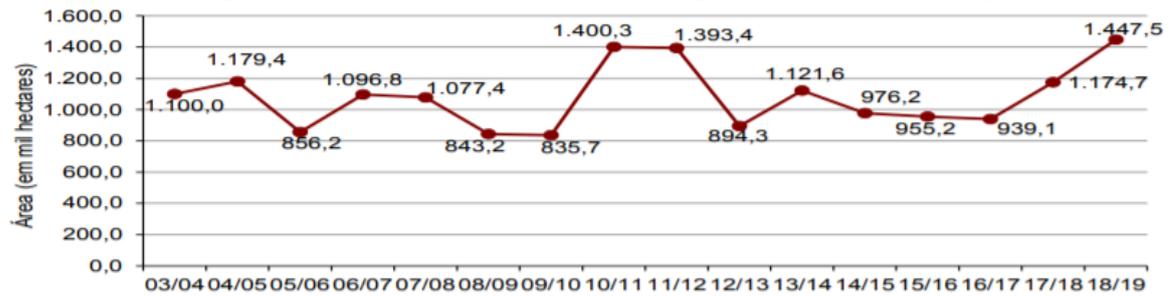
### 2.1 Aspectos gerais da cultura do algodão e potencial econômico

O algodão (*Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch) pertence à família Malvaceae, tem origem entre 5 a 10 milhões de anos, apresenta cerca de 45 espécies diploides ( $2n=2x=26$ ; genomas A-G e K) e cinco espécies tetraploides ( $2n=4x=52$ ; genoma AD) (ULLOA, 2014; RODRIGUES et al., 2016). Dentre todas as espécies de *Gossypium*, apenas quatro apresentam valor econômico e por esse motivo são cultivadas, as diploides *G. arboreum* e *G. herbaceum* e as tetraploides *G. barbadense* e *G. hirsutum* (CARVALHO, 2008a).

A domesticação dessas quatro espécies ocorreu em diferentes regiões do mundo: *G. arboreum* na Índia e no Paquistão; *G. herbaceum* na Arábia e Síria; *G. barbadense* na América do Sul; e *G. hirsutum* na Mesoamérica (D'EECKENBRUGGE e LACAPE, 2014). Dentre essas, destaca-se *G. hirsutum*, explorada economicamente em mais de 100 países com dois principais produtos: a fibra com variadas aplicações industriais e o óleo utilizado na alimentação e produção de energia (HENRIQUE e LACA-BUENDÍA, 2010).

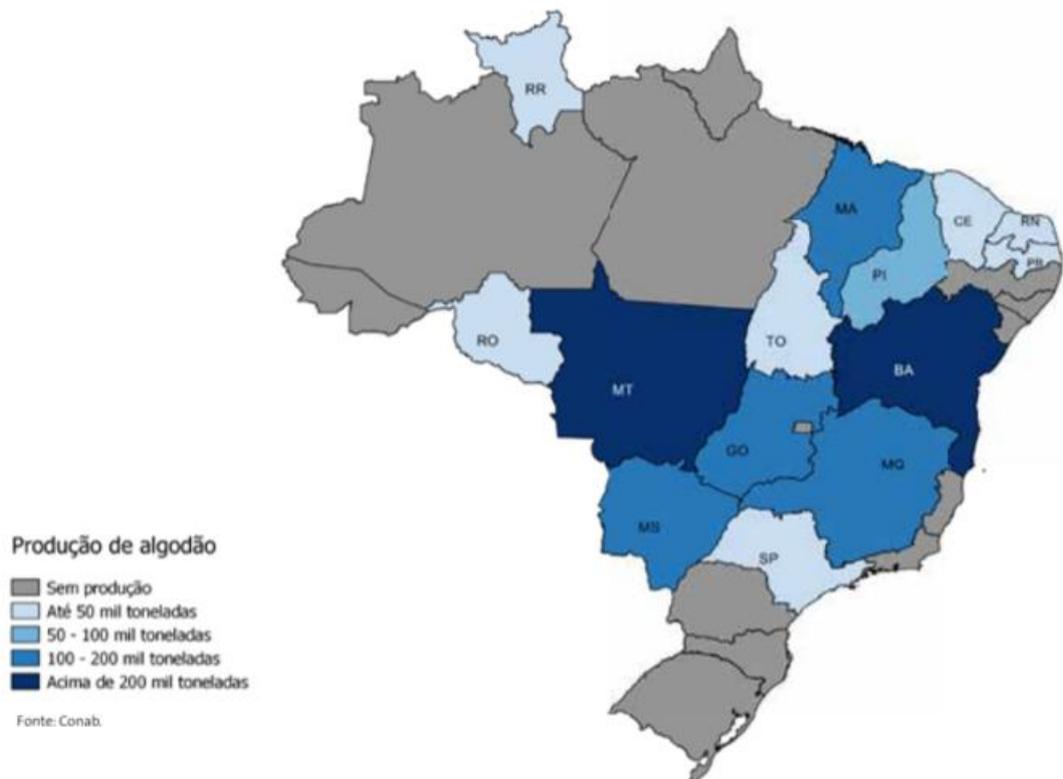
O Brasil, nos últimos anos, vem se mantendo entre os cinco maiores produtores mundiais, ao lado de países como Índia, EUA, China e Paquistão. Entretanto, se considerar a produtividade em sequeiro, o Brasil ocupa o primeiro lugar e está entre os países que mais exportam no mundo (ABRAPA, 2018b).

No que diz respeito a área plantada, houve um aumento gradativo nos últimos 16 anos e a expectativa é que o país alcance na safra 2018/2019 a maior área já plantada com a cultura no país, podendo chegar a 1.447,5 mil hectares (Figura 1). Este incremento recorde em área plantada é decorrente do bom desempenho das cotações da pluma tanto no mercado interno quanto no externo. Esse cenário promissor estimulou os produtores nacionais a investirem fortemente na lavoura (CONAB, 2018).

**Figura 1.** Comportamento da área cultivada com algodão no Brasil ao longo de 16 anos

Fonte: CONAB (2018).

A produção de algodão acontece em várias regiões brasileiras (Figura 2), sendo a Centro-Oeste a maior produtora tanto de algodão em caroço quanto em pluma, com 4.219,2 mil t e 1.688,0 mil t, respectivamente. A segunda maior produtora é a região Nordeste com 1.465,7 mil t em caroço e 588,5 mil t em pluma. Os principais estados produtores são Mato Grosso (3.919,2 mil t em caroço/ 1.567,7 mil t em pluma) e Bahia (1.271,4 mil t em caroço/ 508,6 mil t em pluma) (CONAB, 2018).

**Figura 2.** Mapa da produção de algodão no Brasil

Fonte: CONAB (2018).

A cotonicultura é considerada uma atividade de importância econômica e social, já que a planta do algodoeiro pode ser aproveitada de diversas formas, na indústria têxtil,

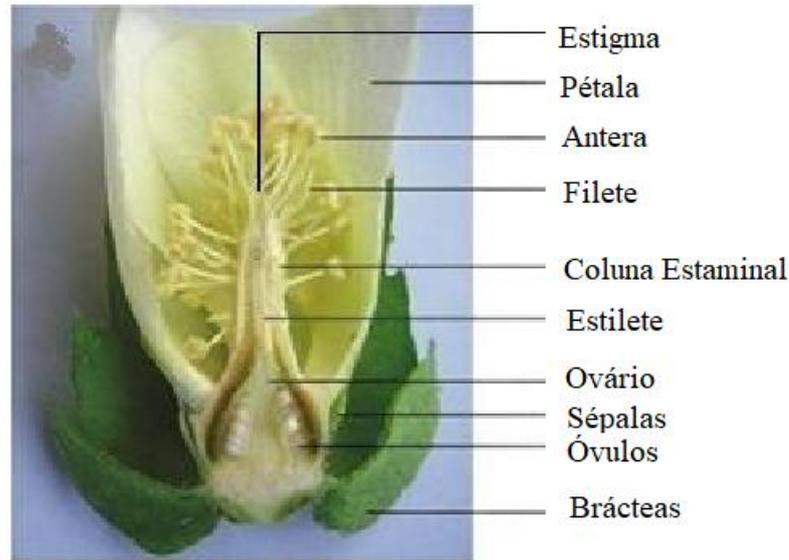
alimentar, oleoquímica, entre outras (FREIRE, 2015). Devido a tal importância, a demanda mundial por esta cultura tem aumentado gradativamente, com um crescimento médio de 2% ao ano (ABRAPA, 2018a).

## **2.2 Anatomia da flor do algodoeiro e reprodução**

O aparelho de reprodução do algodoeiro possui estrutura hermafrodita (andrógina), simétrica (actínomorfa) e com polinização realizada pela ação de insetos (entomófila), propiciando tanto a autofecundação quanto a polinização cruzada (MUNRO, 1987). O algodoeiro possui flores completas, que apresentam os quatro verticilos florais. São isoladas, pedunculadas, com simetria radial e protegidas por três brácteas, que são cordiformes, livres e persistentes (PASSOS, 1982). A cor varia do branco ao creme, tornando-se violácea após ser fecundada. Cada ramo frutífero produz, em média, seis a oito botões que depois se transformam em flores. Contudo, cerca de 20% dos botões abortam naturalmente, sendo referidos como queda ou "shedding" (PENNA, 1999).

Na flor do algodoeiro, o androceu, apresenta aproximadamente dez fileiras de estames, com a coluna estaminal (andróforo) envolvendo o estilete até a altura do estigma (Figura 1). Cada filete, que mede de três a sete milímetros, possui uma antera e se encontra alinhado em cinco fileiras duplas longitudinais. As anteras, de coloração creme, são mesofixas e de deiscência longitudinal. O ovário é considerado súpero, com três a cinco carpelos e três a cinco lóculos, cada um apresenta de oito a dez óvulos de placentação marginal-central. Os grãos de pólen contêm tanto o núcleo vegetativo quanto o reprodutivo, ambos possuem um diâmetro de 199  $\mu\text{m}$ , enquanto os óvulos são um pouco maiores, variando de 24 a 50 por flor, e estão no interior do ovário (OLIVEIRA, 2007).

**Figura 3.** Secção longitudinal da flor do algodoeiro



Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2007).

Por volta do 35º dia após a germinação tem-se início a floração, processo esse que perdura por aproximadamente 60 dias, variando de acordo com a cultivar e com o manejo. O botão floral, a partir do desenvolvimento meristemático, passa por várias fases até culminar com a abertura da flor (Tabela 1). Após a abertura, a flor encontra-se apta a ser fertilizada. Quando esse processo acontece a coloração das pétalas vai de amarelo ou creme para o violáceo, o que representa início da fertilização (PASSOS, 1982; BELTRÃO e AZEVEDO, 2008).

Após a fecundação, as fibras do algodão se desenvolvem a partir das células epidérmicas da semente, que são derivadas dos órgãos florais, denominadas de tricomas (ZHANG et al., 2013a). Cada fibra se forma de uma única célula que se alonga cerca de 1 mm por dia, até chegar ao tamanho final, que varia de acordo com a cultivar e com as condições edafoclimáticas. Milhares de fibras são formadas em cada semente, o número, comprimento e espessura variam de acordo com o genótipo. No caso do *G. hirsurtum* o número de fibras presente em uma única semente chega a variar de 7000 a 15000 (FELTRIN, 2007).

**Tabela 1.** Principais eventos biológicos relacionados aos estádios de desenvolvimento do botão floral do algodoeiro.

Diâmetro (mm)	Evento
2	Formação das células-mãe do pólen (PCM) na antera
4	PCMs em prófase e células do tapete da antera em diferenciação
6-8	Micrósporos unicelulares encontrados nos lóculos
10	Início da degeneração do tapete da antera
12	Divisões mitóticas no pólen e degeneração do tapete da antera
14	Grânulos de pólen binucleados
16	Saco embrionário com dois núcleos
18-20	Sacos embrionários completos

Fonte: Quintanilha et al. (1962).

### 2.3 Expressão gênica

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação hereditária contida em um gene é processada em um produto gênico. Este processo é um dos principais responsáveis pela interação genótipo x ambiente (SCHNEIDER, 2018). Dada a importância, vários são os estudos relacionados ao genoma, termo utilizado para designar o conjunto de genes dos organismos, onde gene é definido como: “região localizável de sequência genômica, a qual corresponde a uma unidade de herança e que está associada a regiões regulatórias, regiões transcritas e/ou outras regiões funcionais” (PEARSON, 2006; GERSTEIN et al., 2007).

*Arabidopsis thaliana* foi uma das primeiras espécies vegetais que teve o seu genoma inteiramente sequenciado no ano de 2000, desde então houve um grande aumento no número de genomas sequenciados, o que foi possível pelo desenvolvimento de novas tecnologias (HUQ et al., 2016). Atualmente várias são as espécies que também possuem seu genoma sequenciado, dentre as quais está o algodão (*G. arboreum*) (LI et al., 2014). O sequenciamento do genoma de diferentes espécies gera inúmeros benefícios nas diversas áreas do conhecimento.

A descoberta de novos genes, suas funções, onde se expressam, trouxe consideráveis avanços para o estudo dos produtos gênicos. As ciências conhecidas como ômicas, surgiram como ferramentas moleculares essenciais para abordar questões biológicas importantes (VAN DIJK et al., 2014). A primeira dessas ômicas a surgir foi a genômica, que visa compreender a organização dos genes e a informação genética no DNA. Posteriormente surgiram a transcriptômica, que avalia o conjunto das moléculas de RNA expressas pelo genoma e a proteômica, que estuda o conjunto completo das proteínas sob certas condições (ERCIYES, 2015).

A ciência que reúne todas as informações obtidas por essas ômicas é a Genômica Funcional, também conhecida como Biologia de Sistemas, que busca detalhar a elucidação da função que cada gene exerce no organismo, bem como a interação destes genes dentro de uma rede biológica (GSTAIGER e AEBERSOLD, 2009; ALTELAAR et al., 2013).

O avanço das pesquisas nas áreas da genômica e pós-genômica têm gerado uma infinidade de informações que têm colaborado para uma melhor compreensão de perfis de expressão de genes e função de proteínas.

## **2.4 Proteômica do algodão**

A proteômica vem contribuindo expressivamente no que diz respeito a compreensão sobre o funcionamento dos sistemas biológicos, permitindo uma análise ampla das proteínas de uma célula, tecido ou órgão (BAGINSKY, 2009). A análise proteômica refere-se a um conjunto de metodologias que são utilizadas na caracterização de um proteoma, que consiste nas proteínas que se expressam em determinadas condições específicas ou em dado estágio de desenvolvimento de um organismo (HUANG et al., 2014).

Diversos fatores internos e externos influenciam o proteoma. Desta forma, ele não é considerado estático, pois pode mudar de acordo com o desenvolvimento do organismo, bem como com qualquer mudança ambiental. Portanto, a caracterização e o estudo de mapas proteômicos torna-se uma importante ferramenta para auxiliar os estudos de genômica (CAVECCI, 2014). O conhecimento do mapa proteômico expresso em condição estressante, fornece inúmeras vantagens, pois permite que se tenha uma compreensão mais ampla das alterações de regulação gênica causadas por condições adversas (HUANG et al., 2014). Através da análise proteômica é possível classificar padrões temporais de acúmulo de proteínas e desta forma identificar aquelas que se acumulam diferencialmente nos vários estágios fisiológicos (SILVEIRA et al., 2008).

O estudo proteômico do algodão contribuiu consideravelmente para o avanço da cultura nas últimas décadas. Os estudos adicionais acerca dos aspectos bióticos e abióticos vem auxiliando os programas de melhoramento da cultura, no entendimento da adaptação as mudanças climáticas.

Tais estudos têm permitido investigar proteínas expressas, bem como sua função, além de explicar como elas respondem as condições ambientais adversas. Muitas destas moléculas possuem função essencial na regulação da resposta ou no processo de adaptabilidade, o que permite que os organismos se recuperem (HAKEEM et al., 2012).

Várias pesquisas com enfoque em proteínas envolvidas na fase reprodutiva do algodoeiro vêm sendo desenvolvidas, visto que a formação e o desenvolvimento de flores é um processo complexo controlado por sinais ambientais e endógenos (BRAMBILLA e FORNARA, 2013).

Um importante grupo de proteínas envolvidas na diferenciação dos tecidos vegetais, em especial no desenvolvimento floral, é o MADS-box (HEMMING e TREVASKIS, 2011). Alguns exemplos de proteínas desse grupo em algodão incluem: GhMADS1, GhMADS4, GhMADS5, GhMADS6 e GhMADS7 que se expressam em flores, óvulos e fibras (LIGHTFOOT et al., 2008); GbAGL1 e GbAGL2 desempenham papéis no desenvolvimento de óvulos ou fibras (LIU et al. 2010); GhMADS11 é relacionada ao alongamento celular (LI et al., 2011). GhMADS22 é envolvida na promoção da floração, além de retardar a senescência do algodão, podendo ser uma forte candidata para promover a maturação precoce, em trabalhos de seleção assistida (ZHANG et al., 2013a).

Ártico et al. (2014) demonstraram elevada expressão dos transcritos GhPME-like1, Gh $\beta$ Gal-like1 e GhPL-like1 em estames, comparados com outros órgãos florais, mas também foram expressos em pétalas, sépalas e carpelos.

A identificação de proteínas nos tecidos reprodutivos representa uma ferramenta importante no melhoramento de plantas, seja relacionado com a precocidade ou na obtenção de cultivares resistentes a estresses bióticos e abióticos que danificam as plantas no decorrer da fase reprodutiva.

Diversas técnicas, incluindo eletroforese e espectrometria de massas, estão disponíveis para a comparação quantitativa e qualitativa do proteoma de plantas, elas permitem separar, identificar e quantificar as proteínas de toda planta ou de um tecido específico (ZHANG et al., 2013b).

### 2.4.1 Ferramentas disponíveis para o estudo de proteômica

A eletroforese é uma técnica de separação de proteínas sob a influência de um campo elétrico, seja pelo uso de gel unidimensional (SDS-PAGE), bidimensional (2D) ou separação dos peptídeos por cromatografia líquida (LC). Nos dois primeiros casos, as proteínas são excisadas do gel e em seguida são digeridas por proteases, como a tripsina, em peptídeos e estes analisados no espectrômetro de massas (ROHRBOUGH et al., 2006)

A espectrometria de massas é uma técnica importante para identificação de proteínas, pois através dela é possível determinar a sequência primária, modificações pós-traducionais ou interações proteína-proteína (AEBERSOLD e MANN, 2003). Juntamente com programas computacionais e acessos a bancos de dados públicos, essa técnica permite melhor anotação e caracterização das proteínas.

Várias são as etapas envolvidas no estudo proteômico, desde a preparação da amostra, separação proteica, visualização das proteínas e identificação da mesma. É de suma importância a otimização de todas as etapas envolvidas no processo para que haja uma melhor qualidade nas análises, permitindo a visualização de proteínas de difícil detecção (TOWNSEND, 2014).

Para o sucesso de estudos de proteômica a extração de proteínas é determinante, já que essa etapa interfere significativamente na qualidade, bem como na quantidade de proteínas detectadas (SHAW e RIEDERER, 2003; XU et al., 2008). Devido à presença de diversos compostos interferentes, o processo de extração é laborioso, pois esses compostos interferem na pureza, integridade, separação e identificação das proteínas (WANG et al., 2008).

Por esse motivo, alguns passos são fundamentais na extração de proteínas, entre eles o rompimento celular, a inativação ou remoção de interferentes e a solubilização das proteínas (TABB, 2013). Estas etapas precisam ser as mais simples possíveis para que os resultados possam ser reproduzíveis.

O primeiro passo é o rompimento celular e vários procedimentos podem ser utilizados, tais como a lise osmótica, processo no qual a célula é colocada em meio hipotônico, havendo aumento do seu volume e posterior quebra da membrana (ELIAS et al., 2004), a lise por detergentes e a lise enzimática. A maceração com o uso de nitrogênio líquido, juntamente com a adição de PVPP (Polivinilpolipirrolidone), substância que minimiza a presença de compostos fenólicos é outro procedimento bastante utilizado (WANG et al., 2008).

Após o rompimento celular, vários interferentes como polissacarídeos, proteases e ligninas precisam ser inativados. A remoção desses interferentes pode ser feita a partir da

adição do tampão TCA/acetona, adicionando 2-mercaptoetanol (2ME). Posteriormente são feitas sucessivas lavagens com solventes orgânicos para que sejam eliminados a maioria dos compostos fenólicos. Após esse processo obtém-se um sedimento (pellet) de coloração esbranquiçada, onde deve ser adicionado um tampão aquoso para ser feita a solubilização de proteínas (WANG et al., 2008). A solubilização das proteínas pode ser realizada com auxílio de detergentes não-iônicos e de compostos caotrópicos como a uréia e a tiouréia que juntas aumentam a solubilidade das proteínas e atuam quebrando as ligações não-covalentes (MÉCHIN et al., 2003).

Os métodos de extração de proteínas podem diferir entre espécies vegetais e entre tecidos de uma mesma planta, desta forma, a escolha do protocolo ideal depende do tipo, da composição química e do estágio fisiológico da amostra (GÖRG et al., 2004). É importante salientar também que os diferentes métodos de extração podem favorecer determinados tipos de proteínas.

Diversos métodos vêm sendo avaliados visando a obtenção de uma extração de melhor qualidade. Entre os protocolos mais testados estão: o método baseado no reagente fenol (HURKMAN e TANAKA, 1986), TCA (ácido tricloroacético) (DAMERVAL et al., 1986), e atualmente alguns que envolvem a união de um ou mais protocolos como o fenol-SDS-TCA (WANG et al., 2008).

De acordo com alguns estudos, o método fenol (HURKMAN e TANAKA, 1986) detecta uma alta intensidade de proteínas de baixo e alto peso molecular se comparado ao método TCA (DAMERVAL et al., 1986), que não é eficiente na extração de proteínas de baixo peso molecular.

Outra etapa fundamental para a análise proteômica é a quantificação das proteínas totais. Dentre os métodos espectrofotométricos mais utilizados está o proposto por Bradford (1976), considerado como um dos mais sensíveis e rápidos, e que pode ser utilizado em vários tipos de amostras como produtos alimentícios, tecidos de plantas e outros (ZAIA et al., 1998). Esse método possibilita uma maior determinação de proteínas através da ligação ao corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250, essa interação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente no comprimento de onda de 595 nm (COMPTON e JONES, 1985).

#### 2.4.2 Espectrometria de massas e identificação dos peptídeos

De acordo com a finalidade do trabalho e com base na análise dos géis, as proteínas de interesse são excisadas e processadas, para só assim serem identificadas através da espectrometria de massas (MS) (QUIRINO et al., 2010).

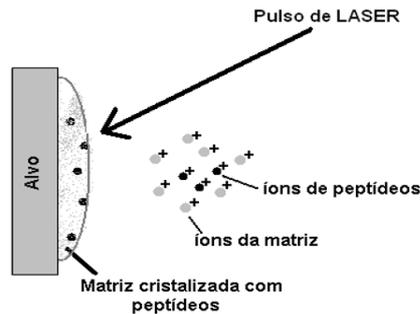
A espectrometria de massas é uma técnica versátil considerada indispensável na interpretação de informações obtidas na eletroforese, por permitir a identificação, quantificação e caracterização das proteínas e peptídeos e assim fazer a comparação dessas sequências com aquelas depositadas em banco de dados de domínio público (AHMADI e WINTER, 2019).

O espectrômetro de massas é dividido em três partes: um sistema de ionização das moléculas, um analisador de massas e um detector. Vários são os métodos de ionização de massas, mas os mais utilizados são a dessorção ionizante assistida por matriz (MALDI) e a ionização por eletrodispersão (ESI), ambos são conhecidos como ionização brandas, ou “*Soft Ionization*”, pois a formação dos íons não leva a perda da integridade das amostras. Nestes métodos, os peptídeos são convertidos em íons através do ganho ou perda de um ou mais prótons (SINGHAL et al., 2015). Os analisadores de massas variam em seus princípios físicos e performance analítica, sendo os principais o tempo de voo (TOF), o quadrupolo (Q) e o aprisionamento de íons (IT) (HAN et al., 2008).

O método MALDI-TOF utilizado para análise *peptide mass fingerprint (PMF)*, compara a massa dos peptídeos obtida no espectro com a massa de peptídeos de uma proteína em determinada base de dados (STEEN e MANN, 2004; OLIVEIRA et al., 2014).

Em relação a esta técnica (Figura 4), a amostra de proteínas, previamente digerida com tripsina, é misturada a uma solução matriz. A mistura é colocada sobre a placa de MALDI e após secar é colocada no espectrômetro de massas onde ocorre a dessorção das moléculas pela incidência de laser sobre a matriz/amostra. A energia do laser faz com que essas moléculas passem para o estado gasoso e fiquem eletricamente carregadas. Após esse processo, as moléculas são separadas pelo analisador de tempo de voo (TOF) de acordo com a relação massa/carga, o que quer dizer que moléculas mais leves (com menor relação massa/carga) se deslocam mais rápido através do analisador quando comparada com as moléculas mais pesadas (com maior relação massa/carga) (SOMEMERER et al., 2006).

**Figura 4.** Ilustração dos processos que ocorrem durante a técnica MALDI-TOF



Fonte: Adaptado de Nyman (2001).

Para cada pulso de Laser é produzido um espectro de massas. O primeiro passo após a obtenção dos espectros é a deisotopagem, feita por um programa de processamento de dados que remove os picos que venham a causar identificação falsa de proteínas. Após esse processo, os espectros obtidos são então submetidos a um banco de dados para que as proteínas sejam identificadas (MAGALHÃES, 2008).

Através da espectrometria de massas os espectros são interpretados e as informações convertidas em sequências de aminoácidos ou massas de peptídeos que funcionam como uma espécie de “impressão digital” da proteína (*peptide mass fingerprint*) (SHEVCHENKO et al., 2001). Essas informações são então comparadas com bancos de dados como o SWISSprot (<http://www.expasy.ch/>) ou o NCBIprot (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação das proteínas.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Cultivo de plantas e coleta de material vegetal

Plantas da cultivar BRS 8H foi mantida em campo experimental na Embrapa Algodão em Campina Grande – PB, Brasil (7°13'50"S, 35°52'52"W e 551 m), sob fotoperíodo natural. Do início da floração até a fase final, dos 45 aos 125 dias, foram coletados botões florais de diferentes tamanhos (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 mm), congelados imediatamente com o uso de N<sub>2</sub> líquido e acondicionados a -80 °C para posterior extração de proteínas.

#### 3.2 Extração de proteínas totais

Foram testados dois protocolos de extração de proteínas, TCA (DAMERVAL et al., 1986) e o método TCA associado ao método fenol (TCA/ Fenol) (HURKMAN e TANAKA, 1986). Para estabelecer a metodologia de extração mais adequada, foram usados botões florais de 10, 12 e 14 mm, a partir de 200 mg de tecido macerados em nitrogênio líquido.

No método TCA, após a maceração dos botões, foi adicionado 1 mL de TCA 10% (ácido tricloroacético) contendo 0,07% de β-mercaptoetanol. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante descartado, logo em seguida foram feitas duas lavagens do pellet com a adição de acetona 80% gelada, contendo 0,07% de β-mercaptoetanol, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C. Por último uma lavagem com a adição de acetona 80% pura, seguido de centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o tubo aberto colocado em freezer -20 °C durante 1h para secagem do pellet. Em seguida, foi adicionado aproximadamente 150 µL de tampão de ressuspensão uréia:tiuréia (7M:2M) para solubilização do pellet.

Nas proteínas extraídas pelo método TCA/ Fenol adicionou-se ao macerado 1 mL de TCA 10% (ácido tricloroacético) contendo 0,07% de β-mercaptoetanol. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante descartado, logo em seguida foram feitas duas lavagens do pellet com acetona 80% gelada, contendo 0,07% de β-mercaptoetanol e por último uma lavagem com acetona 80% pura, seguido de centrifugação nas mesmas condições descritas acima.

Após essa primeira etapa, foram adicionados ao pellet 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, EDTA 50 mM pH 8,0, β-mercaptoetanol 2%, sacarose 0,7 M, PVPP 0,2%, PMSF 2 mM e KCl 0,1 M), e as amostras mantidas sob agitação constante a 4 °C por

30 minutos. Após a incubação, adicionou-se 500  $\mu$ L de fenol equilibrado com Tris e os tubos foram mantidos novamente sob agitação por 30 min a 4 ° C.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C por 10 minutos. A fase fenólica (fase superior), cerca de 300  $\mu$ L, foi transferida para outro tubo e adicionou-se 5 vezes o volume de acetato de amônio 0,1 M em metanol, em relação ao volume da fase fenólica obtida, incubando-se as amostras por aproximadamente 18 horas a temperatura de 20 °C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C por 10 minutos. O precipitado proteico foi lavado uma vez com metanol (gelado) e outras duas vezes com acetona gelada. As lavagens foram seguidas de centrifugações a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C.

As amostras foram colocadas para secar, com os tubos abertos, na capela de exaustão, em temperatura ambiente. Após a secagem, o pellet foi solubilizado em 50  $\mu$ L de tampão ureia: tiourea (7M:2M). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando Albumina do Soro Bovino para curva padrão e quantificadas via espectrofotômetro BioMate (Thermo Science).

### **3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (1DE)**

O método utilizado para separação das proteínas foi o SDS-PAGE 1DE, que baseia-se na separação de proteínas pela sua massa molecular, devido à combinação do tratamento das proteínas com SDS (LAEMMLI, 1970).

As amostras, com quantidades conhecidas de proteínas, foram preparadas adicionando-se o mesmo volume de tampão de amostra 2X (Tris HCL 0,5 M pH 6,8; SDS 20%;  $\beta$ -mercaptoetanol 10%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,04%).

O gel de separação foi preparado na concentração final de 12% (acrilamida 30%, solução Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%), enquanto que o gel de empilhamento foi preparado na concentração de 5% (acrilamida 30%, solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4%). Aplicou-se 50  $\mu$ g de proteínas totais em cada poço e a separação das proteínas ocorreu em cuba de eletroforese vertical em tampão de corrida (Tris-base 250 mM, glicina 1,92 M, SDS 1%), com voltagem constante (300 V), corrente de 17 mA nos 30 minutos iniciais e o tempo restante a 34 mA. Foi usado como padrão um marcador de peso molecular (miosina,  $\beta$ -galactosidase, Fosforilase b, Albumina sérica, Ovalbumina, Anidrase carbônica, Inibidor de tripsina, Lisozima e Aprotinina) (Bio-Rad) (KDa).

Após a corrida o gel foi imerso em uma solução corante (sulfato de amônio 8%, ácido fosfórico 0,8%, *Coomassie Brilliant Blue* G-250 0,08%, metanol 20%) por no mínimo 16 horas, sob agitação (MARCELLINO e GROSSI, 1998).

### 3.4 Tripsinização

As bandas diferencialmente acumuladas e aquelas constantes em todos os tamanhos dos botões florais foram excisadas manualmente do gel e imersas em solução descorante (50% de metanol e 2,5% de ácido acético) *overnight*. Posteriormente, foi adicionado às amostras 100  $\mu\text{L}$  de tampão aquoso (bicarbonato de amônio 50 mM) e após 5 min a solução foi descartada e então adicionado 100  $\mu\text{L}$  de tampão orgânico (tampão aquoso mais acetonitrila 100%, 1:1, v/v) durante 10 min e a solução foi descartada. Em seguida, foram reduzidas em 100  $\mu\text{L}$  de DTT (10 mM) durante 1 hora a 50 °C e, logo após, alquiladas em 100  $\mu\text{L}$  de IAA (50 mM) por 1 hora a temperatura ambiente, no escuro. As etapas de adição do tampão aquoso e orgânico foram repetidas. Após esse processo, as amostras foram deixadas na capela de exaustão por aproximadamente 5 min para que o gel secasse, quando então foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 50% e incubado a temperatura ambiente, por 5 min. Depois foi adicionado 8  $\mu\text{L}$  de tripsina e incubado por 10 min na geladeira, o excesso foi retirado, adicionou-se 8  $\mu\text{L}$  de tampão aquoso e incubou-se *overnight*. Após incubação, foram adicionados às amostras 4  $\mu\text{L}$  de TFA 10% e 4  $\mu\text{L}$  de tripsina, submetidas a agitação por 5 min e centrifugadas. O sobrenadante foi coletado para análise por espectrometria de massas (LUCENA, 2016).

### 3.5 Espectrometria de massa e sequenciamento de peptídeos

A espectrometria de massa foi realizada no AutoFlex III ToF/ToF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), através de MALDI-TOF MS, no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, Recife-PE, Brasil. As amostras provenientes da tripsinização foram concentradas usando Speed vac, em seguida ressuspendidas em 5  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1% e então misturadas com a solução matricial ( $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinâmico 1%; acetonitrilo 50%; TFA 0,3%) na proporção 3:1 (3  $\mu\text{L}$  matriz: 1  $\mu\text{L}$  amostra). Esta mistura foi depositada em uma placa alvo MTP 384 e incubada à temperatura ambiente até que as amostras secassem. O equipamento foi calibrado utilizando-se uma mistura peptídica  $[M + H]^+$  íons para a calibração padrão de MALDI-ToF/MS, na proporção 1:1 (v/v). Os parâmetros foram ajustados, excluindo íons com relação  $m/z \leq 700$  da, intensidade do laser na faixa de 50%; e

2100-4000 tiros acumulados por espectro. Posteriormente foram gerados, de cada amostra, arquivos peaklist.xml a partir do FlexAnalysis 3,4.

### 3.6 Identificação de peptídeos

Os espectros de massas obtidos foram analisados na base de dados MASCOT ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) que disponibiliza a técnica analítica *Peptide mass fingerprinting* (PMF), a qual utiliza várias bases de dados para identificação de proteínas. Para a identificação das proteínas de botão floral foram escolhidas as bases de dados do SWISSProt e do NCBIprot (<http://www.uniprot.org/>), em função de serem bases de dados exclusivas de proteínas, baseado na taxonomia Viridiplantae.

Selecionaram-se as proteínas que obtiveram um escore de correspondência significativa ( $p \leq 0,05$ ). Em seguida, as sequências FASTA obtidas no UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) foram então analisadas no BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), considerando-se o alinhamento apenas para o gênero *Gossypium*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração e quantificação de proteínas

A extração de proteínas é um dos pontos cruciais para a obtenção de resultados em análises proteômicas, especialmente em plantas que podem apresentar baixo teor proteico e produzir diversos tipos de metabólitos secundários (LUQUE-GARCIA et al., 2011). Vários são os protocolos de extração de proteínas disponíveis na literatura, entretanto protocolos para botões florais de algodoeiro ainda não estão bem definidos.

Inicialmente, para estabelecer o protocolo de extração mais adequado para botões florais de algodoeiro foram testados dois métodos: i) Método TCA; ii) Método TCA/ Fenol. As concentrações das proteínas obtidas por cada método de extração estão apresentados na Tabela 2, onde pode-se observar que a quantificação das proteínas extraídas pelo método TCA quando comparadas ao método TCA/ Fenol foi inferior.

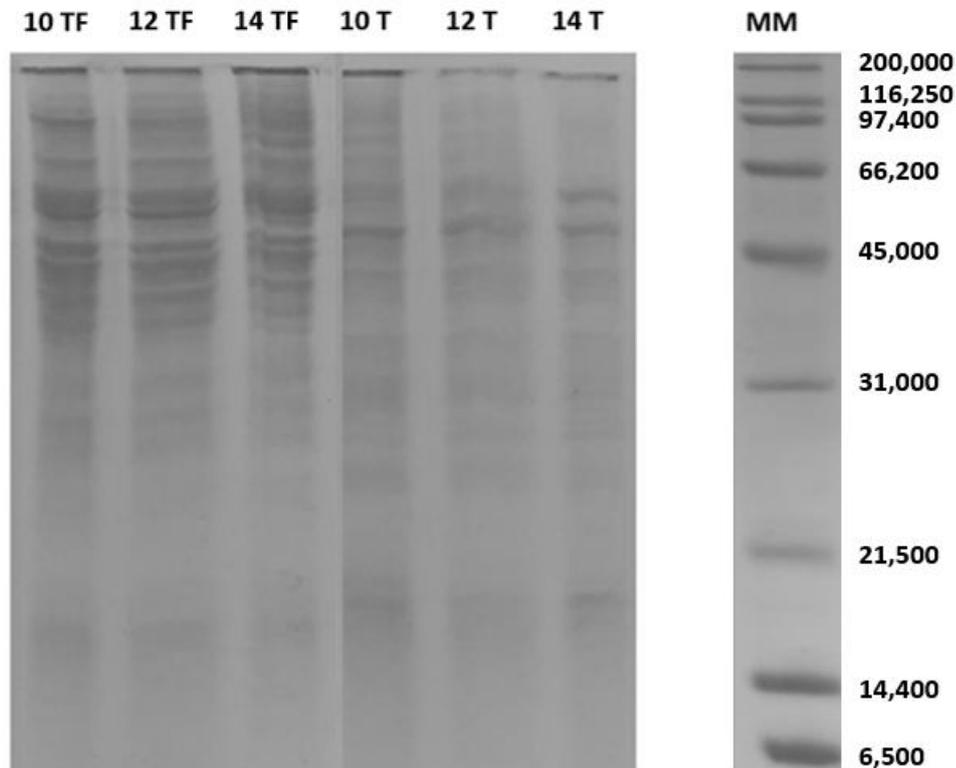
**Tabela 2.** Quantificação de proteínas de botões florais pelo método de Bradford baseada nos métodos TCA e TCA/ Fenol.

Botão Floral (mm)	Proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	TCA	TCA/ Fenol
10	1127,4	4335,4
12	1007,4	2871,4
14	2551,4	4079,4

Os resultados de extração proteica obtidos a partir do método TCA mostrou rendimento proteico satisfatório, contudo foi inferior ao TCA/ Fenol que proporcionou rendimento duas a três vezes maior quando comparado ao método TCA. Este fato pode ocorrer devido ao método TCA não permitir completa precipitação das proteínas, bem como pela dificuldade de solubilização das mesmas (XU et al., 2008). No método TCA/ Fenol se obteve alta concentração devido a adequada recuperação e solubilização das proteínas em uma grande amplitude de massa molecular.

A superioridade do método TCA/ Fenol para extração de proteínas de botão floral de algodoeiro foi confirmada após a corrida eletroforética, onde foi possível observar uma maior acumulação de proteínas em uma grande amplitude de massa molecular quando comparado ao método TCA (Figura 5).

**Figura 5.** Eletroforese em SDS-PAGE (12%) de proteínas totais extraídas de botões florais de algodoeiro através de diferentes métodos de extração. A coloração do gel foi realizada com azul de Coomassie Brilliant Blue G-250. MM- Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (KDa); 10, 12, 14 - Tamanho dos botões florais (mm); TF - extração pelo método TCA/ fenol; T - extração pelo método TCA.



O sucesso deste método deve-se ao fato do fenol minimizar a degradação de proteínas, além de proporcionar resultados satisfatórios em tecidos que contêm alto teor de compostos interferentes que afetam a pureza, integridade, separação e posterior identificação das proteínas de interesse (SARAVANAN e ROSE, 2004; WANG et al., 2008). Este método tem sido amplamente utilizado para extrair proteínas de plantas que apresentam muitos interferentes, como a oliva e o algodão (WANG et al., 2003; YAO et al., 2006), bem como de frutas como banana e morango (VINCENT et al., 2006; WANG et al., 2008).

Em função dos resultados obtidos o método TCA/ Fenol foi adotado para os posteriores trabalhos de extração das proteínas de botões florais.

#### 4.2 Eletroforese Unidimensional (1DE) e análise das proteínas

As proteínas das amostras extraídas pelo método TCA/ Fenol foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 1DE, no qual observou-se a qualidade e integridade das

mesmas. Os valores da concentração de proteínas dos botões florais variaram, o que pode ser observado na Tabela 3.

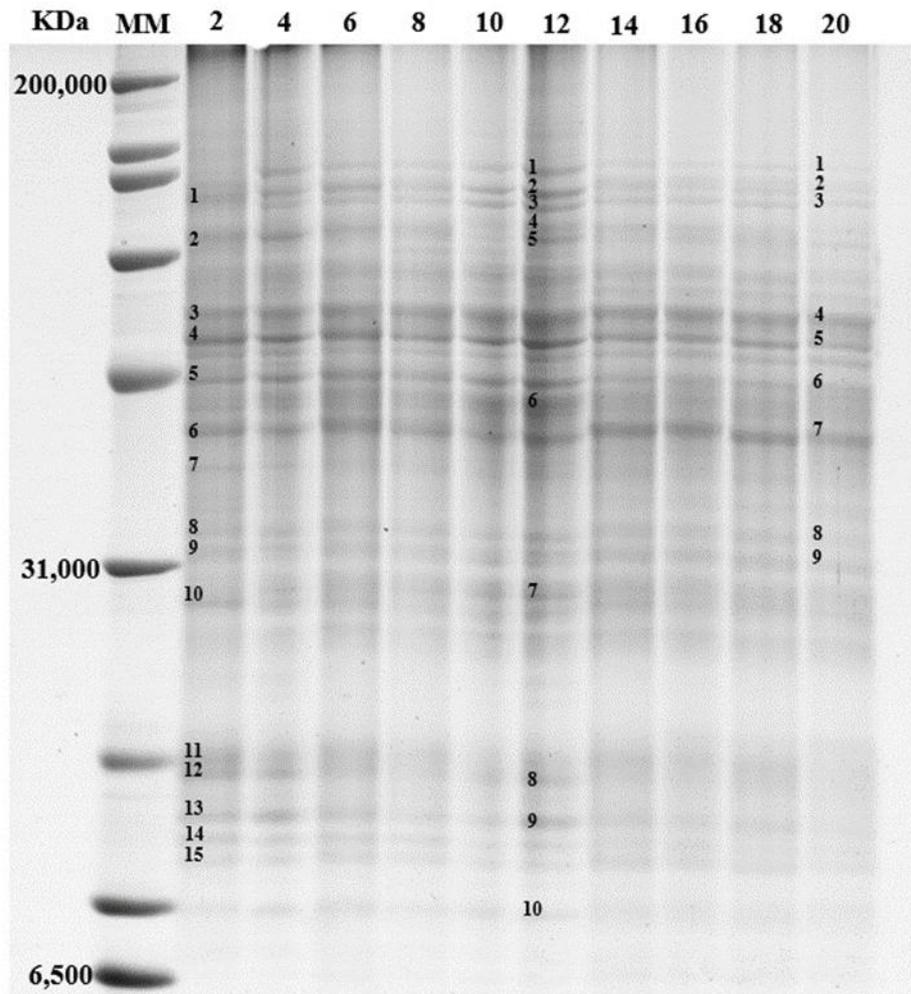
**Tabela 3.** Quantificação pelo método de Bradford das proteínas totais dos diferentes tamanhos de botões florais (2 a 20 mm) de algodoeiro.

Botão Floral (mm)	Proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ ) TCA/ Fenol
2	832,5
4	3112,5
6	1432,5
8	1572,5
10	2102,5
12	2412,5
14	1092,5
16	1652,5
18	772,5
20	1042,5

A partir da análise da concentração de proteínas dos diferentes tamanhos de botão floral, constatou-se uma diminuição do rendimento proteico nos botões de 14 a 20 mm. Isso levanta a hipótese que o método escolhido pode não ser o mais adequado para extração de proteínas nesses tamanhos de botão.

Na Figura 6 encontra-se o perfil de proteínas totais de botões florais (2 a 20 mm) onde observou-se um perfil proteico semelhante entre os diferentes tamanhos analisados, com massa molecular variando entre 200 e 14,4 kDa. Contudo, observou-se bandas diferencialmente acumuladas em alguns tamanhos de botão floral. Também foi possível observar que entre a faixa de 66,2 e 31 kDa houve uma concentração maior de proteínas ao longo da ontogenia do botão.

**Figura 6.** Identificação das bandas escolhidas com diferentes pesos moleculares para análise via espectrometria de massas. MM- Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (KDa); 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20- Tamanho dos botões florais (mm).



A partir da análise do perfil proteico foram escolhidos, para posterior análises em espectrometria de massas, os tamanhos de 2 mm, onde tem início a diferenciação dos primórdios florais, de 12 mm pois neste estágio o botão floral se encontra em atividade celular intensa, incluindo divisões mitóticas nos grãos de pólen, redução da parede celular, formação dos sacos embrionários completos, surgimento e degeneração das antípodas (QUINTANILHA et al., 1962) e de 20 mm por ser o estágio final antes da abertura da flor. Neste estágio o botão floral encontra-se com os sacos embrionários completos.

As bandas desses três tamanhos de botão floral foram excisadas para estudos através de espectrometria de massas. No total foram obtidas 34 bandas, 15 delas no botão de 2 mm, 10 no de 12 mm e as outras 9 no de 20 mm (Figura 6).

Os dados obtidos com a espectrometria de massas foram submetidos, inicialmente, a análises nos bancos de dados Swissprot e NCBIprot/ Viridiplantae. Em virtude da

metodologia utilizada para separação das proteínas (eletroforese 1DE) não permitir uma separação eficiente, como se espera com a eletroforese 2DE, esperava-se que cada banda poderia conter mais de uma proteína. Portanto, foram identificadas 241 proteínas, 109 destas corresponderam a proteínas não caracterizadas, ou seja, proteínas novas que abrem perspectivas para estudos de inovação. As demais proteínas identificadas, um total de 132, possuem papéis celulares claros, mas apenas 6 delas apresentaram score significativo quando comparadas com os bancos de dados. Este fato acontece devido a análise nos espectros da MS permitir a identificação de uma ou poucas proteínas mais abundantes, cujos sinais de intensidade alta interferem na detecção de outras proteínas que possam estar presentes com sinais baixos.

As análises das bandas selecionadas dos diferentes tamanhos de botão floral foram realizadas na base de dados *PMF* e os resultados de significância baseados nos scores de similaridade das bases SWISSprot e NCBIprot, nas quais determinam como significativo o mínimo de 59 e 81, respectivamente. Nas 15 bandas do botão de 2 mm, a análise possibilitou a identificação de 100 proteínas. Destas, 46 não estão caracterizadas nos bancos de dados públicos, enquanto as demais estão caracterizadas, entretanto apenas 3 apresentaram score significativo (Tabela 4). Em se tratando das 10 bandas do botão floral de 12 mm, foram identificadas 70 proteínas diferentes, das quais 38 são proteínas caracterizadas, mas nenhuma delas com score significativo e as 32 restantes não possuem caracterização (Tabela 5). Já as 9 bandas do botão floral de 20 mm apresentaram 71 proteínas diferentes, 40 caracterizadas, sendo 3 delas significativas, enquanto 31 não estão caracterizadas (Tabela 6). A partir destes resultados é possível inferir aspectos funcionais do proteoma de botão floral de algodoeiro, bem como sua associação com fatores fisiológicos e metabólicos.

**Tabela 4.** Anotação presumida das proteínas caracterizadas e identificadas em botão floral de 2 mm de acordo com os scores de similaridade encontrados após análise na base de dados MASCOT ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Banda</b>	<b>Acesso</b>	<b>Proteínas identificadas</b>	<b>Score</b>	<b>Massa</b>
<b>1</b>	HMOX2_ORYSJ	Provável heme oxigenase inativa 2, cloroplasto	39	36689
	ACCO2_DORSP	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase 2	38	37393
	DF286_ARATH	Proteína semelhante à defensina 286	38	8673
	KVI00293.1	Ligação nucleotídica, trança alfa-beta	54	37060
	RK16_LIRTU	Proteína ribossômica 50S L16, cloroplasto	35	15257
<b>2</b>	GLGL1_SPIOL	Subunidade grande da glicose-1-fosfato adenililtransferase	32	2235
	FLP3_ORYSJ	Flowering-promoting factor 1-like protein 3	36	13627
	BAK07973.1	Proteína prevista	52	50630
	ACCO2_ARATH	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase 2	38	36388
<b>3</b>	MOCOS_ORYSJ	Cofatur Sulfureto De Molibdênio	43	92975
	PAP9_ARATH	Proteína 9 associada a lipídio plastidial, cloroplasto	31	34184
	XP_006356792.1	Transbase de ubiquitina E3 tipo RBR	60	41442
	CDPK9_ARATH	Proteína quinase dependente de cálcio 9	41	60724
<b>4</b>	ASK3_ARATH	Proteína semelhante a SKP1 3	33	18524
	EC_MAIZE	Homólogo de proteínas EC	29	8669
	YCF4_IPOPU	Photosystem I assembly protein Ycf4	38	21624
	JOIN_SOLLC	Proteína MADS-box JOINTLESS	31	30636
	ATPAM_PHAVU* <sup>1</sup>	ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial	63	55595
<b>5</b>	BAS87087.1	Os03g0820800 proteína	56	14478
	CML28_ORYSJ	Proteína provável de ligação ao cálcio CML28	53	18680
	CDY07294.1	Proteína BnaC05g26560D	68	8401
	RR8_TUPAK	Proteína ribossômica 30S S8, cloroplasto	52	14984
	NMAT1_ARATH	Nuclear intron maturase 1, mitocondrial	36	82340
<b>6</b>	KMZ63256.1	Remorin	57	26438
	G3PC_PETCR	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato, citosólica	34	36463
	PP306_ARATH	Pentatricopeptide repeat-containing protein At4g11690	38	64657
<b>8</b>	STKLU_ARATH	Provável fator de transcrição At5g28040	28	47048
	PARP3_ORYSJ	Poly [ADP-ribose] polimerase 3	32	93542
<b>9</b>	XP_019258460.1	Proteína não específica de transferência lipídica	52	13279
	LSM4_TOBAC	Proteína LS-4 semelhante a Sm associada ao Provável snRNA U6	40	16003
	RR7_NEPOL	Proteína ribossômica 30S S7, cloroplasto	43	17801
	PT314_ARATH	Provável fosfato de açúcar / translocador de fosfato At3g14410	31	37769

Tabela 4, Cont.

<b>10</b>	RK22_MAIZE	Proteína ribossômica 50S L22, cloroplasto	45	17701
	CID11_ARATH	Proteína de interação de proteína de ligação a poliadenilato 11	42	39326
<b>11</b>	VATA_VIGRR	Subunidade catalítica A de ATPase dos prótons do tipo V	38	68923
	RRP2_SPIOL	Proteína ribossômica 30S 2, cloroplasto	44	28390
	CHSA_IPOTR	Chalcona sintase A	38	40959
<b>12</b>	KCW52485.1	Fosfolipase fosfolipase C	66	36874
	MP704_ARATH	Proteína associada a microtúbulos 70-4	37	67503
	EC1_WHEAT	Proteína CE I / II	36	8676
	KVH91698.1	Proteína ribossômica 40S S24	58	11112
	EXB10_MAIZE	Expansin-B10	47	29836
	RAD_ANTMA* <sup>1</sup>	Transcription factor RADIALIS	60	10768
<b>13</b>	RZ22A_ARATH	Serine/arginine-rich splicing factor RSZ22A	36	22073
	ISS1_ARATH	Aminotransferase aromática ISS1	46	44132
	GLNB_ORYSJ	Homólogo de proteína reguladora de nitrogênio P-II	42	22744
	XTH4_ARATH	Xiloglucano endotransglucosilase / proteína hidrolase 4	36	34497
<b>14</b>	NPL42_ARATH	Proteína semelhante a NPL4 2	46	46368
	SUS7_ORYSJ	Sacarose sintase 7	39	98418
	ABB46830.1	Proteína de Transposon, subcategoria putativa, CACTA, En / Spm	68	16063
	CAA48413.1	Proteína BPF-1	56	77363
	YCF4_WELMI	Photosystem I assembly protein Ycf4	33	21450
<b>15</b>	ACH42614.1	Maturase K	60	13871
	FBD38_ARATH* <sup>1</sup>	Proteína F-box associada a FBD At5g56380	63	50670

\*Proteína significativa. <sup>1</sup>Base de dados SWISSprot; <sup>2</sup>Base de dados NCBIprot.

**Tabela 5.** Anotação presumida das proteínas caracterizadas e identificadas em botão floral de 12 mm de acordo com os scores de similaridade encontrados após análise na base de dados MASCOT ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Banda</b>	<b>Acesso</b>	<b>Proteínas identificadas</b>	<b>Score</b>	<b>Mass</b>
<b>1</b>	ATPAM_PHAVU	ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial	33	55595
	RK22_MAIZE	Proteína ribossômica 50S L22, cloroplasto	38	17701
	GSOX4_ARATH	Monoxigenase contendo flavina FMO GS-OX4	43	52768
	ASHR3_ARATH	N-metiltransferase de histona-lisina ASHR3	32	58080
	YCF4_WELMI	Photosystem I assembly protein Ycf4	39	21450
<b>2</b>	ABB46830.1	Proteína de Transposon, subcategoria putativa, CACTA, En / Spm	60	16063
	KZV37037.1	NADH desidrogenase	58	13004
	RP8HA_ARATH	Proteína de resistência à doença RPH8A	32	106167
<b>3</b>	GSTU7_ARATH	Glutathione S-transferase U7	37	26153
	KAT6_ORYSJ	Canal de potássio KAT6	39	67252
<b>4</b>	ACPM2_ARATH	Proteína portadora de acilo 2, mitocondrial	41	14215
	PSBF_TUPAK	Citocromo b559 subunidade beta	24	4834
	GGPP6_ARATH	Geranylgeranyl pyrophosphate sintase 6, mitocondrial	38	37204
	CLV3_ARATH	Proteína CLAVATA 3	25	10920
<b>5</b>	RR8_TUPAK	Proteína ribossômica 30S S8, cloroplasto	36	14984
	KMZ62817.1	Hidroximetilglutaril-CoA liase	54	46417
	CBZ39511.1	Proteína Td4TF1	48	5455
	UBC11_ARATH	Enzima Conjugadora de Ubiquitina E2 11	52	16711
	XP_016902148.1	Provável Fator de Transcrição WRKY 13 isoforma X2	56	27656
	DF286_ARATH	Proteína semelhante à defensina 286	46	8673
<b>6</b>	XP_017227193.1	Frutose-bisfosfato aldolase	63	42798
	EAAC_ARATH	ADP de envelope provável, proteína transportadora de ATP, cloroplasto	57	41976
	NDHI_LOBMA	NAD (P) subunidade I-quinona	31	19963
	RK16_OEDCA	Proteína ribossômica 50S L16, cloroplasto	41	15633
<b>7</b>	YCF4_IPOPU	Photosystem I assembly protein Ycf4	42	21624
	MT1_ERYGU	Proteína tipo metalotioneína 1	38	8027
	FDL15_ARATH	Proteína putativa F-box / FBD / LRR-repeat At2g05300	42	51206
<b>8</b>	PP415_ARATH	Proteína contendo repetição de pentatricopeptídeo At5g43790	39	52239
	GRC13_ORYSJ	Glutaredoxina-C13	33	11580
	RK16_CHLSP	Proteína ribossômica 50S L16, cloroplasto	43	15487
	MAN1_ORYSJ	Mannan endo-1,4-beta-manosidase 1	40	46960

<b>9</b>	RZ21A_ORYSJ	Serine/arginine-rich splicing factor RSZ21A	44	21342
	H33_HORVU	Histona H3.3	35	9284
		Proteína contendo domínio B3		
	Y4814_ORYSJ	Os04g0581400	31	34773
<b>10</b>	RK16_HORVU	Proteína ribossômica 50S L16, cloroplasto	44	15680
	YCF4_PANGI	Photosystem I assembly protein Ycf4	46	21312
	DRPD_CRAPL	Proteína relacionada à dessecação PCC27-45	35	16316

\*Proteína significativa.

**Tabela 6.** Anotação presumida das proteínas caracterizadas e identificadas em botão floral de 20 mm de acordo com os scores de similaridade encontrados após análise na base de dados MASCOT ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Banda</b>	<b>Acesso</b>	<b>Proteínas identificadas</b>	<b>Score</b>	<b>Mass</b>
<b>1</b>	ATPAM_PHAVU	ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial	37	55595
	GLGL1_SPIOL	Subunidade grande da glicose-1-fosfato adenililtransferase	32	2235
	EC_MAIZE	Homólogo de proteínas EC	30	8669
	BGL23_ARATH	Beta-glucosidase 23	41	60196
<b>2</b>	GAT19_ORYSI	Fator de transcrição GATA 19	40	29479
	GRC13_ORYSJ	Glutaredoxina-C13	33	11580
	YP_007475742.1	Proteína ribossômica L16	61	15660
	YCF4_LACSA	Photosystem I assembly protein Ycf4	47	21406
<b>3</b>	PP288_ARATH	Proteína contendo repetição de pentatricopeptídeo At3g60050	47	54927
	C3H44_ORYSJ	Proteína contendo o domínio CCCH dedo de zinco 44	43	30945
	ILI7_ORYSI	Fator de transcrição ILI7	21	10015
<b>4</b>	IAA9_ARATH	Proteína responsiva a auxina IAA9	37	36781
	RK36_CHLRE	Proteína ribossômica 50S L36, cloroplasto	18	4428
	RK16_LIRTU	Proteína ribossômica 50S L16, cloroplasto	43	15257
	Y5142_ARATH	Proteína contendo domínio B3 At5g60142	40	40507
	PIA33414.1* <sup>2</sup>	Proteína semelhante a retículo	82	25706
<b>5</b>	RK16_CHLSC	Proteína ribossômica 50S L16, cloroplasto	44	15561
<b>6</b>	DG783_ARATH	DNA glicosilase putativo At3g47830	38	33516
	NDUS8_TOBAC	NADH desidrogenase [ubiquinona] proteína Ferro-enxofre 8, mitocondrial	34	26793
	C3H13_ARATH	Proteína contendo o domínio CCCH dedo de zinco 13	34	9844
	AS1_ARATH	Fator de transcrição AS1	34	42559
	ACPM2_ARATH* <sup>1</sup>	Proteína portadora de acilo 2, mitocondrial	59	14215
<b>7</b>	DF257_ARATH	Proteína putativa defensina 257	36	9329
	PANS2_ARATH	Proteína PATRONUS 2	24	21900
	KHG04963.1	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato	72	31470
	G3PC_DIACA	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato, citosólica	44	37105
	PIM99013.1	Alfa-manosidase	64	22744
	MATK_PANGI	Maturase K	47	59670
	IAN8_ARATH	Proteína de ligação a nucleotídeos associada a imunização 8	40	40272
	G3PC3_ORYSJ	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3, citosólico	46	36716
	PSR87510.1* <sup>2</sup>	Desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato	83	36712

	TPP9_ORYSJ	Provável fosfatase de fosfato de trealose 9	46	40531
	PSBL_MESVI	Sistema de reação do fotossistema II proteína L	28	4472
	CH10_ARATH	Chaperonina de 10 kDa, mitocondrial	33	10806
<b>8</b>	FBD23_ARATH	Proteína F-box putativa associada a FBD At5g56400	38	53418
	CDY27151.1	Proteína BnaA08g07890D	26	3931
	MEM12_ARATH	Membrin-12	36	25146
	CDPK7_ORYSJ	Proteína quinase dependente de cálcio 7	38	61627
<b>9</b>	M2K6_ARATH	Proteína cinase quinase 6 ativada por mitógeno	32	40153
	IAAS_ORYSJ	Inibidor da alfa-amilase / subtilisina	37	21689

\*Proteína significativa. <sup>1</sup>Base de dados SWISSprot; <sup>2</sup>Base de dados NCBIprot.

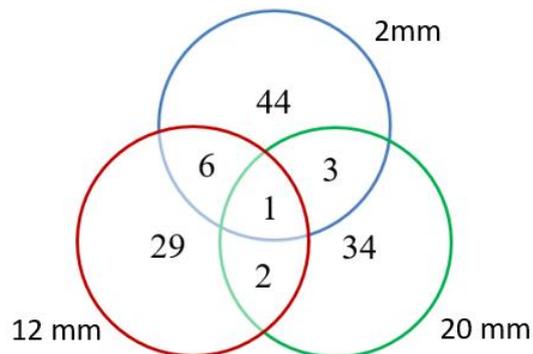
Das 132 proteínas identificadas que possuem seus papéis celulares claros, algumas, apesar de não terem apresentado score significativo quando comparadas nas bases de dados SWISSprot e NCBIprot, merecem destaque. No botão floral de 2 mm pode-se destacar as proteínas Chalcona sintase e Maturase K (MatK). A Chalcona sintase é uma proteína chave na biossíntese de flavonóides/ isoflavonóides. Estes flavonóides estão presentes em diversas plantas e estão relacionados com diversas funções, como pigmentos, fitoalexinas, protetores de UV, moléculas sinalizadoras em interações planta-patógeno, antioxidantes, além de atrair polinizadores, bem como impedir que os mesmos se alimentem. Em outras palavras, esses compostos vegetais únicos desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente (YILMAZ e TOLEDO, 2004; DAO et al., 2011). A MatK é necessária para o processo de *splicing* que remove os íntrons e junta os éxons depois da transcrição do RNA. Os genes MatK são regiões altamente variantes do DNA de plantas, mais especificamente dos cloroplastos, que podem servir como potenciais biomarcadores para o DNA e também na geração de primers para identificação de motivos únicos em angiospermas (BISWAL et al., 2012).

No botão floral de 12 mm foi identificada a proteína CLAVATA 3, que juntamente com proteínas da mesma família, estão relacionadas com etapas-chave no decorrer do desenvolvimento da planta, incluindo a regulação da manutenção do meristema, desenvolvimento de anteras, formação de tecido vascular e arquitetura do sistema radicular (HAZAK e HARDTKE, 2016).

A proteína semelhante a Defensina 257, identificada no botão floral de 20 mm, faz parte de uma grande família de proteínas PR (proteínas relacionadas à patogênese), ou seja, integra um grupo importante de proteínas responsáveis pela defesa de plantas. Esta proteína é ativada em certas fases da ontogenia da planta, bem como durante infecções e sob a influência de fatores de estresse abióticos. Quando ativada, participa de diversas atividades biológicas, como a inibição do crescimento de microrganismos patogênicos e plantas parasitas, além de participar da síntese de proteínas (FINKINA e OVCHINNIKOVA, 2018).

De todas as proteínas identificadas que já foram caracterizadas, 107 são exclusivas: 44 proteínas estão presentes apenas no botão floral de 2 mm, 29 delas no de 12 mm e 34 exclusivas do botão de 20 mm. As 25 proteínas restantes foram comuns, ou seja, se repetiram em pelo menos dois tamanhos de botão floral, sendo seis comuns aos tamanhos de 2 e 12 mm, três delas se repetiram em 2 e 20 mm, duas em 12 e 20 mm e apenas uma nos três tamanhos de botão floral (Figura 7).

**Figura 7.** Distribuição das proteínas caracterizadas e identificadas nos diferentes tamanhos de botões florais.



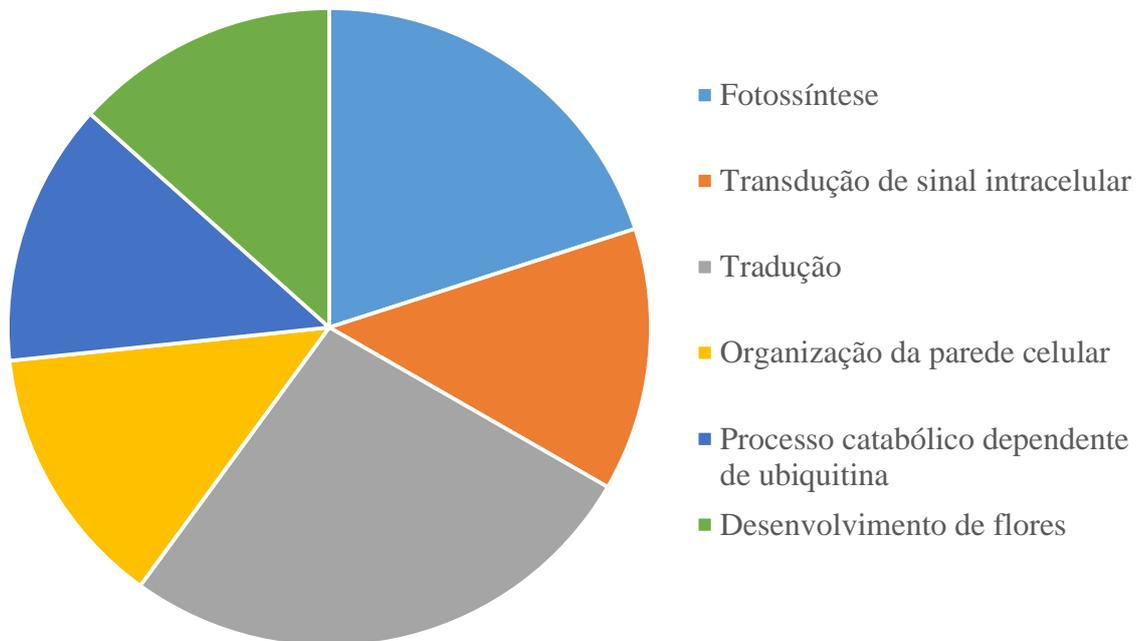
A ontogenia do botão floral é caracterizada por uma série de processos fisiológicos e bioquímicos, os quais estão intimamente relacionados para promover o desenvolvimento da semente. Em se tratando do algodão, estes processos ainda estão envolvidos na formação e alongação dos tricomas, que mais adiante darão origem as fibras (XING et al., 2005; XIAO et al., 2007; MCKIM et al., 2008; ÁRTICO et al., 2014).

Com base na distribuição das categorias Gene Ontology (GO) obtidas por meio da análise das proteínas identificadas em relação aos processos biológicos, foram realizados agrupamentos, de modo que as proteínas de cada fase de desenvolvimento do botão floral avaliada (2, 12 e 20 mm) foram distribuídas em grupos funcionais.

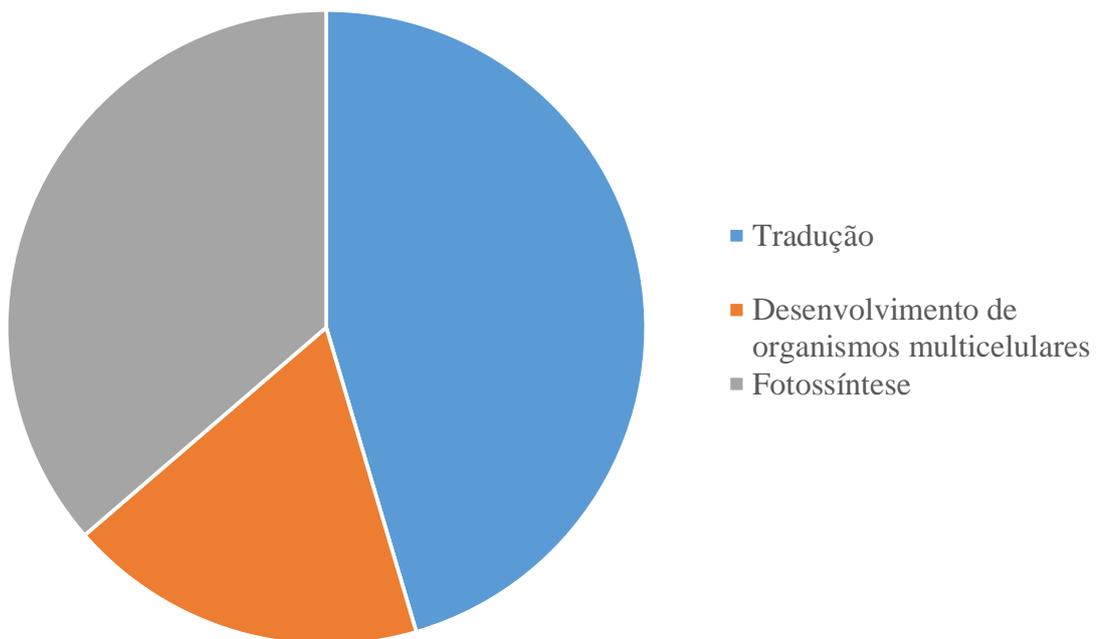
A categorização das proteínas identificadas no botão de 2 mm mostrou que os grupos funcionais mais expressivos foram: tradução (27%), fotossíntese (20%), transdução de sinal intracelular (14%) e organização da parede celular/ processo catabólico de proteínas dependente de ubiquitina/ desenvolvimento de flores (13%) (Figura 8).

Em relação aos grupos funcionais mais significativos das proteínas descritas do botão floral de 12 mm foram: tradução (46%), fotossíntese (36%) e desenvolvimento de organismos multicelulares (18%), como pode ser observado na figura 9.

**Figura 8.** Categorização das proteínas identificadas no botão floral de 2 mm via Gene Ontology.



**Figura 9.** Categorização das proteínas identificadas no botão floral de 12 mm via Gene Ontology.

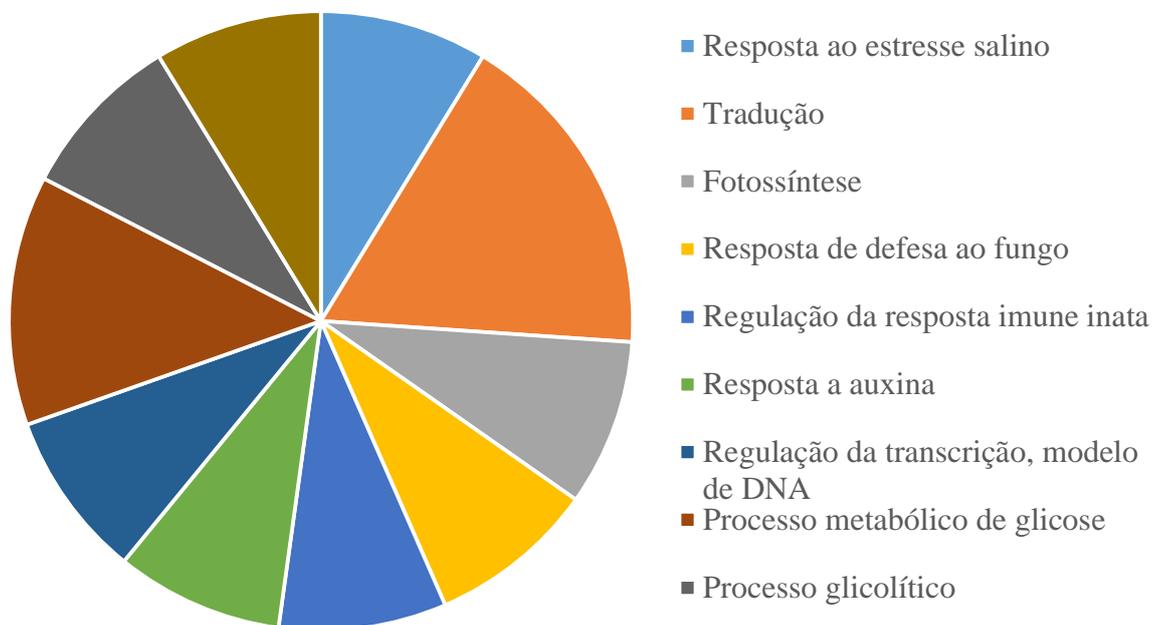


Os principais grupos funcionais identificados nos botões florais de 2 e 12 mm foram de proteínas envolvidas no processo de tradução, onde a mensagem contida no RNAm é

codificada em uma proteína, e no processo da fotossíntese, que é responsável pela produção de energia necessária para a sobrevivência da planta. A predominância destes processos pode ser facilmente explicada já que as plantas, neste caso específico, os botões florais, precisam que estes processos aconteçam durante a ontogenia.

As proteínas identificadas no botão floral de 20 mm foram separadas em nove grupos funcionais: tradução (17%), processo metabólico de glicose (13%), regulação da transcrição, modelo de DNA/ ligação de íons metálicos/ processo glicolítico/ resposta a auxina/ regulação da resposta imune inata/ resposta de defesa ao fungo (9%) e fotossíntese/ resposta ao estresse salino (8%) (Figura 10).

**Figura 10.** Categorização das proteínas identificadas no botão floral de 20 mm via Gene Ontology.



As proteínas presentes no botão floral de 20 mm, como visto acima foram categorizadas em um maior número de grupos funcionais, dentre os quais podemos destacar a tradução, que também foi o processo mais presente nos demais botões e o processo metabólico de glicose que representa a principal fonte de energia dos seres vivos.

#### 4.5 Análise das proteínas significativas

Das 241 proteínas identificadas nas três fases de desenvolvimento do botão floral, utilizando-se as bases de dados SWISSprot e NCBIprot, 6 proteínas foram consideradas significativas por obterem um score de correspondência significativa ( $p \leq 0,05$ ), sendo três delas no botão floral de 2 mm e as outras três no botão floral de 20 mm (Tabela 7).

**Tabela 7.** Proteínas significativas identificadas em botão floral de algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento.

Botão Floral (mm)	Banda	Proteína	Acesso	Massa (Da)/pI
2	4	ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial	ATPAM_PHAVU	55595/6.51
2	12	Fator de transcrição RADIALIS	RAD_ANTMA	10768/9.74
2	15	Proteína F-box associada a FBD At5g56380	FBD38_ARATH	50670/8.89
20	4	Proteína semelhante ao Reticulo	PIA33414.1	25706/9.17
20	6	Proteína portadora de acilo 2, mitocondrial	ACPM2_ARATH	14215/4.87
20	7	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	PSR87510.1	36712/6.34

##### 4.5.1 ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial

A ATP sintase é uma proteína conservada ao longo da evolução e é considerada importante por fornecer energia para as células. Em boa parte dos sistemas, localizam-se nas membranas e são responsáveis pela síntese de ATP a partir de ADP e fosfato, por meio de um movimento de rotação, que se dá pelo fluxo de prótons na membrana, provocado pela transferência de elétrons (FUTAI, 2006).

Estudos com *A. thaliana* demonstraram que mutações em uma das subunidades da ATP sintase, mais especificamente na subunidade atp1-1178, prejudica a montagem da mesma nas mitocôndrias, resultando no retardo do crescimento e desenvolvimento das plantas (HAMMANI et al., 2011). Esse retardo se dá porque as plantas necessitam de ATP, a fonte básica de energia para todas as células, para o seu crescimento.

Já em plantas de tabaco transgênico, a repressão de subunidades da ATP sintase fez com que houvesse uma redução no transporte de elétrons, na assimilação de CO<sub>2</sub> e no crescimento dessas plantas. Foi possível observar também que a repressão dessas subunidades interferiu na capacidade fotossintética desse organismo (ROTT et al., 2011; YAMORI et al., 2011).

#### 4.5.2 Fator de transcrição RADIALIS

A proteína RADIALIS está relacionada com a assimetria floral nas plantas, o que é relevante por ser um mecanismo especializado de interação com os polinizadores. Além da RADIALIS, vários são os fatores de transcrição (TFs) envolvidos na morfologia dos órgãos vegetais CYCLOIDEA (CYC), DICHOTAMA (DICH), RADIALIS (RAD) e DIVARICATA (DIV) (HILEMAN, 2014).

Os fatores de transcrição CYC e DICH promovem a expressão de RAD e em conjunto são responsáveis pela identidade dorsal das flores, enquanto o DIV promove a identidade ventral. A expressão da RAD é limitada à região dorsal o que impede que os demais fatores de transcrição, mas especificamente o DIV, atue nessa região (RAIMUNDO et al., 2013).

Em trabalhos desenvolvidos com uma flor conhecida como boca-de-leão (*Antirrhinum* L.), foi possível demonstrar que quando a RAD é ativada na região dorsal da flor em desenvolvimento, a mesma desempenha uma importante função no estabelecimento da assimetria floral (CORLEY et al., 2005).

Em contrapartida um estudo realizado em *G. barbadense* forneceu evidências de uma nova função para este grupo de proteínas, pois houve uma forte expressão deste gene em tecidos de corola e óvulos, com controle potencial do crescimento da fibra de algodão (ZHANG et al., 2011a).

#### 4.5.3 Proteína F-box associada a FBD At5g56380

As proteínas F-box desempenham funções importantes na degradação de proteínas e fazem parte de uma das mais abundantes famílias de proteínas reguladoras. Nas plantas, essas proteínas apresentam papéis diversos e por esse motivo apenas um pequeno grupo foi caracterizado detalhadamente (BAUTE et al., 2017).

Foram identificadas aproximadamente 700 proteínas F-box em *Arabidopsis* (RISSEEUW et al., 2003) e *Oryza sativa* (arroz) (JAIN et al., 2007), e cerca de 350 em *Zea mays* (milho) (JIA et al., 2013). Essas proteínas estão envolvidas em diversos processos biológicos, como desenvolvimento de flores, respostas de defesa, percepção e sinalização

hormonal e embriogênese e desenvolvimento de plântulas (LECHNER et al., 2006; HUA et al., 2011; SCHUMANN et al., 2011).

Estudos realizados demonstraram que proteínas F-box são consideradas essenciais para o desenvolvimento das plantas. Em *A. thaliana* uma proteína F-box foi identificada como um importante regulador do ciclo celular em todos os estágios de desenvolvimento analisados, observou-se que com a perda da função desta proteína o desenvolvimento das plantas, durante o ciclo de vida esporófito e durante a gametogênese, foi prejudicado devido à redução da proliferação celular (NOIR et al., 2015).

#### **4.5.4 Proteína semelhante ao retículo**

A princípio, os reticulons (RTNs) foram descritos em neurônios mamários, como sendo proteínas que integram a membrana do retículo endoplasmático (ER) (ROEBROEK et al., 1993; VAN DE VELDE, 1994). Posteriormente, os genes *RTN* foram identificados também no genoma de todos os eucariotos já estudados (OERTLE et al., 2003; NZIENGUI, 2007). Essas proteínas são encontradas predominantemente no ER tubular, onde atuam como estabilizadores de membrana (VOELTZ et al., 2006).

As proteínas do tipo reticulon (RTNL) foram classificadas em seis subfamílias, que incluem a RTNLB, subfamília de proteínas desse tipo em plantas (OERTLE et al., 2003; SPARKES, 2010). Pouco se sabe sobre as funções e a localização celular desse grupo de proteínas. Em um estudo desenvolvido com *Agrobacterium tumefaciens* três proteínas do tipo reticulon, fundidas com uma proteína verde fluorescente (GFP) foram localizadas na periferia de células de raiz, não sendo encontrada nenhuma associação específica com alguma organela (HWANG e GELVIN, 2004). Entretanto, em estudos posteriores, observou-se que de maneira similar aos reticulons de animais, proteínas semelhantes em plantas foram encontradas distribuídas em todo o ER (HUGUES, 2007).

#### **4.5.5 Proteína portadora de acilo 2, mitocondrial**

A proteína portadora de acilo mitocondrial (ACP) desempenha um papel crítico na síntese de ácidos graxos do tipo II (FASII). Esta proteína interage transitoriamente com um conjunto de enzimas monofuncionais para catalisar a iniciação e o alongamento de cadeias acílicas nascentes (HILTUNEN et al., 2010).

Além da síntese de ácidos graxos, a ACP que está presente em todas as mitocôndrias, também está envolvida na fabricação de moléculas que compõem determinadas gorduras, além de participar da organização de outras proteínas que são importantes para a produção de energia (VAN VRANKEN et al., 2016).

Experimentos realizados em leveduras demonstraram que a ACP se associa a uma máquina molecular que produz aglomerados de enxofre de ferro (FeS) nas mitocôndrias de células em desenvolvimento. Esta interação é necessária, pois sem a mesma as outras proteínas envolvidas no processo não são capazes de trabalhar juntas. Como os aglomerados de enxofre de ferro são essenciais para a vida, isso poderia explicar por que as células não podem sobreviver sem a ACP (VAN VRANKEN et al., 2016).

Por meio de estudos proteômicos e estruturais foi possível demonstrar que a ACP é uma subunidade acessória estável do Complexo Respiratório Mitocondrial I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) que tem como função central a conversão de energia celular (SACKMANN et al., 1991; ANGERER et al., 2014).

#### 4.5.6 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12), é considerada uma proteína chave na via glicolítica (catalisa a sexta etapa). A sua ação é converter o gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-bifosfoglicerato (BGP) na presença do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) (BAKER et al., 2014).

Além da glicólise, a GAPDH encontra-se envolvida na biossíntese de histonas, na manutenção da integridade do DNA, no metabolismo do ferro, no tráfego de membranas e na sinalização celular mediada pelo receptor. Por apresentar funções múltiplas e independentes a GAPDH é considerada uma proteína multifuncional (SIROVER, 2012).

De acordo com sua diversidade de funções, a localização intracelular da GAPDH não está restrita apenas ao citosol para produção de energia, sendo detectada também na membrana plasmática e nuclear, no Retículo Endoplasmático, no Complexo de Golgi e no núcleo (TRISTAN et al., 2011).

Em plantas superiores existem três isoformas distintas de fosforilação de GAPDH: GAPDH citosólico (GAPC), GAPDH cloroplasto (GAPA / A e GAPA / B) e o GAPDH plastidial (GAPCp) (PETERSEN et al., 2003).

Estudos com *A. thaliana* demonstraram que a ruptura do GAPCp leva a alterações no desenvolvimento de pólen que podem estar associadas a mudanças no perfil metabólico das

anteras (MUÑOZ-BERTOMEU et al., 2010). Em arroz, a superexpressão de OsGAPC3 desempenha um papel crucial no que diz respeito a proteção de células e prevenção do acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS) causado por estresse salino, aumentando desta forma a tolerância ao sal em plantas transgênicas (ZHANG et al., 2011b).

Os resultados obtidos neste trabalho trazem importantes informações sobre diversas proteínas expressas no botão floral de algodoeiro, o que permite uma melhor compreensão dos processos celulares que acontecem durante a ontogenia. A identificação e elucidação da atividade de proteínas expressas ao longo do desenvolvimento do botão floral, traz consideráveis avanços e abre um leque de perspectivas para isolamento de promotores específicos que podem ser usados em outros projetos visando a expressão de proteínas de interesse em botão floral, o que vem a contribuir com o melhoramento genético do algodão.

## 5. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos para extração proteica de botão floral evidenciaram que apesar do método TCA ter um bom rendimento, o método TCA/Fenol mostrou-se mais eficiente por apresentar uma alta concentração de proteínas em uma grande amplitude molecular.
- As diferentes fases de desenvolvimento do botão floral (2 a 20 mm) apresentaram um perfil proteico semelhante, mas com algumas bandas diferencialmente acumuladas.
- A metodologia empregada permitiu a identificação de centenas de proteínas acumuladas em botão floral de algodoeiro. Muitas das quais já foram caracterizadas e possuem papéis celulares claros, contudo apenas seis apresentaram score significativo.
- Foram identificadas proteínas importantes durante a ontogenia do botão floral do algodoeiro, com destaque para Chalcona sintase, Maturase K, CLAVATA 3 e Defensina 257.

## REFERÊNCIAS

**ABRAPA - Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Estatística – O algodão no mundo.** Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx>>. Acesso em: 10 de dez. 2018a.

**ABRAPA - Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Estatística – O algodão no Brasil.** Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-brasil.aspx>>. Acesso em: 10 de dez. 2018b.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.

AHMADI, S.; WINTER, D. Identification of Unexpected Protein Modifications by Mass Spectrometry-Based Proteomics. In: KURUC, M.; WANG, X. **Functional Proteomics**. New York: Humana Press, 2019. p. 225-251.

ALTELAAR, A. F.; MUNOZ, J.; HECK, A. J. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. **Nature Reviews Genetics**. v. 14, p. 35-48, 2013.

ANGERER, H.; RADERMACHER, M.; MAŃKOWSKA, M.; STEGER, M.; ZWICKER, K.; HEIDE, H.; WITTIG, I.; BRANDT, U.; ZICKERMANN, V. The LYR protein subunit NB4M/NDUFA6 of mitochondrial complex I anchors an acyl carrier protein and is essential for catalytic activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201322438, 2014.

ARTICO, S.; LAMBRET-FROTTÉ, J.; NARDELI, S. M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; GROSSI-DE-SA, M. F.; ALVES-FERREIRA, M. Isolation and characterization of three new promoters from *Gossypium hirsutum* that show high activity in reproductive tissues. **Plant molecular biology reporter**, v. 32, n. 3, p. 630-643, 2014.

ARTICO, S.; RIBEIRO-ALVES, M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; de MACEDO, L. L. P.; SILVEIRA, S.; GROSSI-DE-SA, M. F.; MARTINELLI, A. P.; ALVES-FERREIRA, M. Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 854, 2014.

BAGINSKY, S. Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 1, p. 93-120, 2009.

- BAKER, B.Y.; SHI, W.; WANG, B.; PALCZEWSKI, K. High- resolution crystal structures of the photoreceptor glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase (GAPDH) with three and four- bound NAD molecules. **Protein Science**, v. 23, n. 11, p. 1629-1639, 2014.
- BATISTA, V. G. L.; PINHEIRO, M. P. N.; FILHO, P.A.M.; SANTOS, R. C.; LIMA, L. M. Temporal and tissue expression of genes involved in buds of earliness cotton cultivar. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7386-7394, 2015.
- BAUTE, J.; POLYN, S.; BLOCK, J.; LIJSEBETTENS, M.; INZE, D. F-box protein FBX92 affects leaf size in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 5, p. 962-975, 2017.
- BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. de. **O agronegócio do Algodão no Brasil**. Campina Grande: Embrapa, 2008.
- BERG, M.; ROGERS, R.; MURALLA, R.; MEINKE, D. Requirement of aminoacyl- tRNA synthetizes for gametogenesis and embryo development in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 44, n. 5, p. 866-878, 2005.
- BISWAL, D. K.; DEBNATH, M.; KUMAR, S.; TANDON, P. Phylogenetic reconstruction in the Order Nymphaeales: ITS2 secondary structure analysis and in silico testing of maturase k (matK) as a potential marker for DNA bar coding. **BMC bioinformatics**, BioMed Central, 2012. p. S26.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein tilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAMBILLA, V.; FORNARA, F. Molecular control of flowering in response to day length in rice. **Journal of integrative plant biology**, v. 55, n. 5, p. 410-418, 2013.
- BRIEFS, ISAAA. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. 2017.
- CARVALHO, L. P. O gênero *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres. In: BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. **O agronegócio do algodão no Brasil**. 2 ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2008a, p. 253-270.

CAVECCI, B. **Caracterização por espectrometria de massas de metaloproteínas em amostras de Tilápia do Nilo**. Botucatu, 2014. 73f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A. DAVIES, H. V.; ENGEL, K. H; GATEHOUSE, A. M. R.; KARENLAMPI, S.; KOK, E. J.; LEGUAY, J. J.; LEHESRANTA, S.; NOTEBORN, H. P. J. M.; PEDERSEN, J.; SMITH, M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 1089-1125, 2004.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: Terceiro levantamento da safra 2018/2019, dezembro, 2018**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra>>. Acesso em: 06 jan. 2019.

CORLEY, S. B; CARPENTER, R.; COPSEY, L.; COEN, E. Floral asymmetry involves an interplay between TCP and MYB transcription factors in *Antirrhinum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 14, p. 5068-5073, 2005.

D'EECKENBRUGGE, G. C.; LACAPE, J. M. Distribution and differentiation of wild, feral, and cultivated populations of perennial upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in Mesoamerica and the Caribbean. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107458, 2014.

da SILVA RODRIGUES, J. I.; de CARVALHO, L. P.; FARIAS, F. J. C. Comparison of wild accessions of *Gossypium barbadense* L. from Peru and Brazil via microsatellite markers. **Bioscience Journal**. v. 32, n. 5, p. 1352-1363, 2016.

DAMERVAL, C.; VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two- dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.

DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 397, 2011.

ERCIYES, K. **Distributed and sequential algorithms for bioinformatics**. Cham: Springer, 2015.

FELTRIN, E. B. **Produtividade e qualidade de fibra de cultivares de algodoeiro em função de doses de nitrogênio**. Ilha Solteira, 2007. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista.

FINKINA, E. I.; OVCHINNIKOVA, T. V. Plant defensins: Structure, functions, biosynthesis, and the role in the immune response. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 261-278, 2018.

FREIRE, E. C. **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: ABRAPA, 2015.

FUTAI, M. Our research on proton pumping ATPases over three decades: their biochemistry, molecular biology and cell biology. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 82, n. 10, p. 416-438, 2006.

GERSTEIN, M. B.; BRUCE, C.; ROZOWSKY, J. S.; ZHENG, D.; DU, J.; KORBEL, J. O.; EMANUELSSON, O.; ZHANG, Z. D.; WEISSMAN, S.; SNYDER, M.. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. **Genome research**, v. 17, n. 6, p. 669-681, 2007.

GÖRG, A. 2-D electrophoresis. **Principles and methods. Handbooks from GE Healthcare. Sweden**, p. 73-75, 2004.

GSTAIGER, M.; AEBERSOLD, R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 617-627, 2009.

HAKEEM, K. R.; CHANDNA, R.; AHMAD, P.; IQBAL, M.; OZTURK, M. Relevance of proteomic investigations in plant abiotic stress physiology. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 16, n. 11, p. 621-635, 2012.

HAMMANI, K.; des FRANCS-SMALL, C. C.; TAKENAKA, M.; TANZ, S. K.; OKUDA, K.; SHIKANAI, T.; BRENNICKE, A.; SMALL, I. The pentatricopeptide repeat protein OTP87 is essential for RNA editing of nad7 and atp1 transcripts in *Arabidopsis* mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M111. 230516, 2011.

HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES III, J. R. Mass spectrometry for proteomics. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 5, p. 483-490, 2008.

HAZAK, O.; HARDTKE, C. S. CLAVATA 1-type receptors in plant development. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 16, p. 4827-4833, 2016.

HEMMING, M. N.; TREVASKIS, B. Make hay when the sun shines: the role of MADS-box genes in temperature-dependent seasonal flowering responses. **Plant Science**, v. 180, n. 3, p. 447-453, 2011.

HENRIQUE, F. H.; LACA-BUENDÍA, J. P. Comportamento morfológico e agrônômico de genótipos de algodoeiro no município de Uberaba – MG. **FAZU em revista**, n. 7, p. 32-36, 2010.

HILEMAN, L. C. Bilateral flower symmetry - how, when, and why? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 17, p. 146-152, 2014.

HILTUNEN, J. K.; AUTIO, K. J.; SCHONAUER, M. S.; KURSU, V. S.; DIECKMANN, C. L.; KASTANIOTIS, A. J. Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1797, n. 6-7, p. 1195-1202, 2010.

HIRST, Judy. Complexo mitocondrial I. **Revisão anual da bioquímica**, v. 82, p. 551-575, 2013.

HUA, Z., ZOU, C., SHIU, S. H.; VIERSTRA, R. D. Phylogenetic comparison of F-Box (FBX) gene superfamily within the plant kingdom reveals divergent evolutionary histories indicative of genomic drift. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e16219, 2011.

HUANG, M.; FANG, Y.; XIAO, Y.; SUN, J.; JIN, Y.; TAO, X.; MA, X.; HE, K.; ZHAO, H. Proteomic analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. **Industrial Crops and Products**. v. 59, p. 299-308, 2014.

HUQ, M. A.; AKTER, S.; JUNG, Y. J.; NOU, S.; CHO, Y. G.; KANG, K. K. Genome Sequencing, a Milestone for Genomic Research and Plant Breeding. **Plant Breeding**, v. 4, n. 1, p. 29–39, 2016.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant physiology**, v. 81, n. 3, p. 802-806, 1986.

HWANG, H. H.; GELVIN, S. B. Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. **The Plant Cell**, v. 16, n. 11, p. 3148-3167, 2004.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; ARORA, R.; AGARWAL, P.; RAY, S.; SHARMA, P.; KAPOOR, S.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed

development, and regulation by light and abiotic stress. **Plant Physiology**, v. 143, n. 4, p. 1467-1483, 2007.

JIA, F.; WU, B.; LI, H.; HUANG, J.; ZHENG, C. Genome-wide identification and characterization of F-box family in maize. **Molecular genetics and genomics**, v. 288, n. 11, p. 559-577, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LECHNER, E.; ACHARD, P.; VANSIRI, A.; POTUSCHAK, T.; GENSCHIK, P. F-box proteins everywhere. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 6, p. 631-638, 2006.

LI, F.; FAN, G.; WANG, K.; SUN, F.; YUAN, Y.; SONG, G.; LI, Q.; MA, Z.; LU, C.; ZOU, C.; CHEN, W.; LIANG, X.; SHANG, H.; LIU, W.; SHI, C.; XIAO, G.; GOU, C.; YE, W.; XU, X.; ZHANG, X.; WEI, H.; LI, Z.; ZHANG, G.; WANG, J.; LIU, K.; KOHEL, R. J.; PERCY, R. G.; YU, J. Z.; ZHU, Y. X.; WANG, J.; YU, S. Genome sequence of the cultivated cotton *Gossypium arboreum*. **Nature genetics**, v. 46, n. 6, p. 567, 2014.

LI, Y.; NING, H.; ZHANG, Z.; WU, Y.; JIANG, J.; SU, S.; TIAN, F.; LI, X. A cotton gene encoding novel MADS-box protein is preferentially expressed in fibers and functions in cell elongation. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 43, n. 8, p. 607-617, 2011.

LIGHTFOOT, D. J.; MALONE, K. M.; TIMMIS, J. N.; ORFORD, S. J. Evidence for alternative splicing of MADS-box transcripts in developing cotton fibre cells. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 279, n. 1, p. 75-85, 2008.

LIU, J.; PANG, C.; WEI, H.; SONG, M.; MENG, Y.; FAN, S.; YU, S. Proteomic analysis of anthers from wild-type and photosensitive genetic male sterile mutant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 390, 2014.

LIU, X.; ZUO, K. J.; XU, J. T.; LI, Y.; ZHANG, F.; YAO, H. Y.; WANG, Y.; CHEN, Y.; QIU, C. X.; SUN, X. F.; TANG, K. X. Functional analysis of GbAGL1, a D-lineage gene from cotton (*Gossypium barbadense*). **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 4, p. 1193-1203, 2010.

LUCAS, F. E. S. R. R.; HAGIWARA, M. K. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, 2004.

LUCENA, V. **Resposta fisiológica, bioquímica, agrônômica e molecular em amendoim submetido a déficit hídrico**. Recife, 2016. 71f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco.

LUQUE-GARCIA, J. L.; CABEZAS-SANCHEZ, P.; CAMARA, C. Proteomics as a tool for examining the toxicity of heavy metals. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 703-716, 2011.

MAGALHÃES, C. S. **Avaliação comparativa de procedimentos de extração de proteínas em plantas medicinais e fitoterápicos e quantificação de metais associados a essas proteínas**. Campinas, 2008. 151f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade Estadual de Campinas.

MARCELLINO, L. H.; GROSSI de SÁ, M. F. Detecção e análise de proteína pela técnica Western Blot. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, p. 251-267.

MCKIM, S. M.; STENVIK, G. E.; BUTENKO, M. A.; KRISTIENSEN, W.; CHO, S. K.; HEPWORTH, S. R.; ALEN, R. B.; HAUGHN, G. W. The BLADE-ON-PETIOLE genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. **Development**, v. 135, n. 8, p. 1537-1546, 2008.

MÉCHIN, V.; CONSOLI, L.; LE GUILLOUX, M.; DAMERVAL, C. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. **PROTEOMICS: International Edition**, v. 3, n. 7, p. 1299-1302, 2003.

MUÑOZ-BERTOMEU, J.; CASCALES-MIÑANA, B.; IRLÉS-SEGURA, A.; MATEU, I.; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R.; SEGURA, J.; ROS, R. The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for viable pollen development in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 152, n. 4, p. 1830-1841, 2010.

MUNRO, J. M. **Cotton**. New York: Longman, 1987.

NAQPAL, P.; ELLIS, C. M.; WEBER, H.; PLOENSE, S. E.; BARKAWI, L. S.; GUILFOYLE, T. J.; HAGEN, G.; ALONSO, J. M.; COHEN, J. D.; FARMER, E. E.; ECKER, J. R.; REED, J. W. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. **Development**, v. 132, n. 18, p. 4107-4118, 2005.

NOIR, S.; MARROCCO, K.; MASOUD, K.; THOMANN, A.; GUSTI, A.; BITRIAN, M.; SCHNITTGER, A.; GENSHIK, P. The control of *Arabidopsis thaliana* growth by cell

proliferation and endoreplication requires the F-box protein FBL17. **The Plant Cell**, p. tpc. 114.135301, 2015.

NYMAN, T. A. The role of mass spectrometry in proteome studies. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 5, p. 221-227, 2001.

NZIENGUI, H.; BOUHIDEL, K.; PILLON, D.; DER, C.; MARTY, F.; SCHOEFS, B. Reticulon- like proteins in *Arabidopsis thaliana*: Structural organization and ER localization. **FEBS letters**, v. 581, n. 18, p. 3356-3362, 2007.

OERTLE, T.; KLINGER, M.; STUERMER, C. A.; SCHWAB, M. E. A reticular rhapsody: phylogenic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 10, p. 1238-1247, 2003.

OLIVEIRA, B. M.; COORSSEN, J. R.; MARTINS-DE-SOUZA, D. 2DE: the phoenix of proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 104, p. 140-150, 2014.

OLIVEIRA, R. S.; OLIVEIRA NETO, O. B.; COSTA, P. H. A.; EVANGELISTA, I. B. R.; LEONARDECZ, E.; ROMANO, E.; COUTINHO, M. V.; VIANA, A. A. B.; SILVA, M. C. M.; ROCHA, T. L.; GROSSI DE SÁ, M. F. **Transformação de algodoeiro via tubo polínico: otimização e perspectivas de aplicação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2007. 30p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 184).

PASSOS, S. M. G. **Algodão**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1982

PEARSON, H. Genetics: what is a gene? **Nature**, v. 441, p. 399-401, 2006.

PENNA, J. C. V. Hibridação em Algodão. In: BORÉM, A. **Hibridação Artificial de Plantas**. Viçosa: UFV, 1999, p. 63-81.

PETERSEN, J.; BRINKMANN, H.; CERFF, R. Origin, evolution, and metabolic role of a novel glycolytic GAPDH enzyme recruited by land plant plastids. **Journal of molecular evolution**, v. 57, n. 1, p. 16-26, 2003.

PINHEIRO, M. P. N.; BATISTA, V. G. L.; MARTINS, N. F.; SANTOS, R. C.; FILHO, P. M.; SILVA, C. R. C.; LIMA, L.M. Genes expressed in cotton (*Gossypium hirsutum*) buds isolated with a subtractive library. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 37-43, 2013.

QUINTANILHA, A, P. S. Boletim da Sociedade Broteriana. Coimbra: Instituto Botânico da Universidade de Coimbra, 1962.

QUIRINO, B. F.; CANDIDO, E. S.; CAMPOS, P. F.; FRANCO, O. L.; KRUGER, R. H. Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 351-362, 2010.

QURESHI, M. I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 10, p. 1239-1260, 2007.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829-1841, 2011.

RAIMUNDO, J. ; SOBRAL, R. ; BAILEY, P. ; AZEVEDO, H. ; GALEGO, L. ; ALMEIDA, J. ; COEN, E. ; COSTA, M. M. A subcellular tug of war involving three MYB- like proteins underlies a molecular antagonism in *Antirrhinum* flower asymmetry. **The Plant Journal**, v. 75, p. 527-538, 2013.

REES, D. M.; LESLIE, A. G.; WALKER, J. E. The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 51, p. 21597-21601, 2009.

RISSEEUW, E. P.; DASKALCHUK, T. E.; BANKS, T. W.; LIU, E.; COTELESAGE, J.; HELLMANN, H.; MARK, E.; SOMERS, D. E.; CROSBY, W. L. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 34, n. 6, p. 753-767, 2003.

ROEBROEK, A. J.; VAN DE VELDE, H. J.; VAN BOKHOVEN, A.; BROERS, J. L.; RAMAEKERS, F.C.; VAN DE VEM, W. J. Cloning and expression of alternative transcripts of a novel neuroendocrine-specific gene and identification of its 135-kDa translational product. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 18, p. 13439-13447, 1993.

ROHRBOUGH, J. G.; BRECI, L.; MERCHANT, N.; MILLER, S.; HAYNES, P. A. Verification of single-peptide protein identifications by the application of complementary database search algorithms. **Journal of Biomolecular Techniques: JBT**, v. 17, n. 5, p. 327, 2006.

ROTT, M.; MARTINS, N. F.; THIELE, W.; LEIN, W.; BOCK, R.; KRAMER, D. M.; SCHOTTLER, M. A. ATP synthase repression in tobacco restricts photosynthetic electron transport, CO<sub>2</sub> assimilation, and plant growth by overacidification of the thylakoid lumen. **The Plant Cell**, p. tpc. 110.079111, 2011.

SACKMANN, U.; ZENSEN, R.; ROEHLEN, D.; JAHNKE, U.; WEISS, H. The acyl- carrier protein in *Neurospora crassa* mitochondria is a subunit of NADH: ubiquinone reductase (complex I). **European journal of biochemistry**, v. 200, n. 2, p. 463-469, 1991.

SARAVANAN, R. S.; ROSE, J. K. C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 2522-2532, 2004.

SCHNEIDER, T.; RIZZARDI, M. A.; NUNES, A. L.; BIANCHI, M. A.; BRAMMER, S. P.; ROCKENBACH, A. P. Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n.1, p. 12-24, 2018.

SCHUMANN, N.; NAVARRO-QUEZADA, A.; ULLRICH, K.; KUHL, C.; QUINT, M. Molecular evolution and selection patterns of plant F-box proteins with C-terminal kelch repeats. **Plant physiology**, v. 155, n. 2, p. 835-850, 2011.

SHAW, M. M.; RIEDERER, B. M. Sample preparation for two- dimensional gel electrophoresis. **PROTEOMICS: International Edition**, v. 3, n. 8, p. 1408-1417, 2003.

SHEVCHENKO, A.; SUNYAEV, S.; LOBODA, A.; SHEVCHENKO, A.; BORK, P.; ENS, W.; STANDING, K. G. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. **Analytical chemistry**, v. 73, n. 9, p. 1917-1926, 2001.

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

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 791, 2015.

SIROVER, M. A. Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: mechanisms of GAPDH intracellular translocation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 113, n. 7, p. 2193-2200, 2012.

SOMEMERER, N.; CENTENO, D.; ROSSIGNOL, M.; THIELLEMENT, T.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C.; MÉCHIN, V. Peptide mass fingerprint: Identification of proteins by MALDI-TOF. **Methods Molecular Biology**, v. 355, p. 219-234, 2006.

SPARKES, I.; TOLLEY, N.; ALLER, I.; SVOZIL, J.; OSTERRIEDER, A.; BOTCHWAY, S.; MUELLER, C.; FRIGERIO, L.; HAWES, C. Five *Arabidopsis* reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties. **The Plant Cell**, v. 22, p. 1333-1343, 2010.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 5, n. 9, p. 699, 2004.

TABB, D. L. Quality assessment for clinical proteomics. **Clinical biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 411-420, 2013.

TOWNSEND, C. M.; BEAUCHAMP, R. D.; EVERS, B. M.; MATTOX, K. L. **Tratado de cirurgia: A base biológica da prática cirúrgica moderna**. 19. ed. [S.l.]: Saunders Elsevier, 2014.

TRISTAN, C.; SHAHANI, N.; SEDLAK, T. W.; SAWA, A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. **Cellular signalling**, v. 23, n. 2, p. 317-323, 2011.

ULLOA, M. The diploid D genome cottons (*Gossypium* spp.) of the New World. In: Abdurakhmonov, I. **World Cotton Germplasm Resources**. 9. ed. Croatia: InTech, 2014, p. 203-229.

VALDES, A.; VALDÉS, A.; SIMÓ, C.; IBÁÑEZ, C.; GARCÍA-CAÑAS, V. Foodomics strategies for the analysis of transgenic foods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 2-15, 2013.

VAN DE VELDE, H. J.; SENDEN, N. H.; ROSKAMS, T. A.; BROERS, J. L.; RAMAEKERS, F. C.; ROEBROEK, A. J.; VAN DE VEN, W. J. NSP-encoded reticulons are neuroendocrine markers of a novel category in human lung cancer diagnosis. **Cancer research**, v. 54, n. 17, p. 4769-4776, 1994.

VAN DIJK, J. P.; de MELLO, C. S.; VOORHILIJZEN, M. M.; HUTTEN, R. C. B.; ARISI, A. C. M.; JANSEN, J. J.; BUYDENS, L. M. C.; VAN DER VOET, H.; KOK, E. J. Safety assessment of plant varieties using transcriptomics profiling and a one-class classifier. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 297-303, 2014.

VAN VRANKEN, J. G.; JEONG, M. Y.; WEI, P.; CHEN, Y. C.; GYGI, S. P.; WINGE, D. R.; RUTTER, J. The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. **Elife**, v. 5, p. e17828, 2016.

VANDERSCHUREN, H.; LENTZ, E.; ZAINUDDIN, I.; GRUISSEM, W. Proteomics of model and crop plant species: status, current limitations and strategic advances for crop improvement. **Journal of proteomics**, v. 93, p. 5-19, 2013.

VINCENT, D.; WHEATLEY, M. D.; CRAMER, G. R. Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters. **Electrophoresis**, v. 27, n. 9, p. 1853-1865, 2006.

VOELTZ, G. K.; PRINZ, W. A.; SHIBATA, Y.; RIST, J. M.; RAPOPORT, T. A. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 573-586, 2006.

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 compounds. **Electrophoresis**, v. 24, n. 14, p. 2369-2375, 2003.

WANG, W.; TAI, F.; CHEN, S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. **Journal of separation science**, v. 31, n. 11, p. 2032-2039, 2008.

XIAO, Y. H.; ZHANG, Z. S.; YIN, M. H.; LUO, M.; LI, X. B.; HOU, L.; PEI, Y. Cotton flavonoid structural genes related to the pigmentation in brown fibers. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 358, n. 1, p. 73-78, 2007.

XING, S.; ROSSO, M. G.; ZACHGO, S. ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 132, n. 7, p. 1555-1565, 2005.

XU, C.; XU, Y.; HUANG, B. Protein extraction for two-dimensional gel electrophoresis of proteomic profiling in turfgrass. **Crop Science**, v. 48, n. 4, p. 1608-1614, 2008.

YAMORI, W.; TAKAHASHI, S.; MAKINO, A.; PRICE, G. D.; BADGER, M. R.; VON CAEMMERER, S. The roles of ATP synthase and the cytochrome b6/f complexes in limiting chloroplast electron transport and determining photosynthetic capacity. **Plant Physiology**, v. 155, n. 2, p. 956-962, 2011.

YAO, Y.; YANG, Y. W.; LIU, J. Y. An efficient protein preparation for proteomic analysis of developing cotton fibers by 2- DE. **Electrophoresis**, v. 27, n. 22, p. 4559-4569, 2006.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 2, p. 255-260, 2004.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHANG, F.; LIU, X.; ZUO, K.; ZHANG, J.; SUN, X.; TANG, K. Molecular cloning and characterization of a novel *Gossypium barbadense* L. RAD-like gene. **Plant molecular biology reporter**, v. 29, n. 2, p. 324-333, 2011a.

ZHANG, J.; ZOU, D.; LI, Y.; SUN, X.; WANG, N. N.; GONG, S. Y.; ZHENG, Y.; LI, X. B. GhMPK17, a cotton mitogen-activated protein kinase, is involved in plant response to high salinity and osmotic stresses and ABA signaling. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95642, 2014.

ZHANG, W.; FAN, S.; PANG, C.; WEI, H.; MA, J.; SONG, M.; YU, S. Molecular Cloning and Function Analysis of Two SQUAMOSA- Like MADS- Box Genes From *Gossypium hirsutum* L. **Journal of integrative plant biology**, v. 55, n. 7, p. 597-607, 2013a.

ZHANG, X. H.; RAO, X. L.; SHI, H. T.; LI, R. J.; LU, Y. T. Overexpression of a cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene OsGAPC3 confers salt tolerance in rice. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, n. 1, p. 1, 2011b.

ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M. C.; YATES III, J. R. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013b.