

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Camila Maurmann de Souza

**ANÁLISE PROTEÔMICA EM *Lippia alba* (VERBENACEAE)(MILL.)
N.E.BROWN**

Dissertação de Mestrado

Juiz de Fora

2017

CAMILA MAURMANN DE SOUZA

ANÁLISE PROTEÔMICA EM *Lippia alba* (VERBENACEAE)(MILL.)

N.E.BROWN

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

JUIZ DE FORA

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Camila Maurmann de.

ANÁLISE PROTEÔMICA EM *Lippia alba*
(VERBENACEAE)(MILL.) N.E.BROWN / Camila Maurmann de
Souza. -- 2017.

111 f.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. *Lippia alba*. 2. Proteômica. 3. Poliploidia. 4. Eletroforese
bidimensional. 5. Espectrometria de massas. 1. Viccini, Lyderson
Facio , orient. li. Título.

CAMILA MAURMANN DE SOUZA
ANÁLISE PROTEÔMICA EM *LIPPIA ALBA* (VERBENACEAE)(MILL.)N.E.BROWN

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso Pós-graduação em Ciências Biológicas, área Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/_____.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Orientador)

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Membro interno)

Dra. Cristiane Zorzatto
(Membro externo)

Dedico a todas as pessoas que me apoiaram nesse percurso,
tornando a concretização deste trabalho possível.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento (CAPES, FAPEMIG e CNPQ) por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Lyderson Viccini pela oportunidade, pela orientação, pela confiança no meu desempenho em uma área completamente nova. Obrigada pelas portas abertas e pelos novos conhecimentos proporcionados.

Ao prof. Dr. Octávio Franco pela compreensão e acolhimento junto aos seus alunos, também pelos conhecimentos transferidos e paciência em ensinar.

À Dra. Cristiane Zorzatto pela compreensão, disponibilidade e conhecimentos compartilhados.

Ao prof. Dr. Carlos Maranduba pela amizade e ajuda em tantos momentos. Obrigada pelas conversas, pelo suporte e por sempre deixar as portas abertas para mim.

A todos os demais professores e profissionais que de alguma forma me apoiaram, ensinaram, aconselharam e fizeram parte da minha formação. Agradeço especialmente ao prof. Dr. Jair Aguiar, a profa. Dra. Priscila de Faria, ao Prof. Dr. Mateus Rodrigues, ao Dr. Eliabe Monteiro e ao prof. Dr. Gilson Macedo.

Agradeço aos membros do laboratório de genética da UFJF, aos colaboradores da UFV e da UCB pela disponibilização de equipamentos e materiais e pela parceria neste trabalho. Agradeço particularmente ao prof. Dr. Wagner Araújo, ao prof. Dr. Octávio Franco, a Dra. Carla Quinhones, Dr. Edvaldo Barros e ao Me. Osmel Fleitas.

Aos profissionais, amigos e colegas de trabalho pelo auxílio, pelas conversas de corredor, pelas discussões científicas, pelos ensinamentos e contribuições.

À Laila Arbex pelo carinho e preocupação mesmo quando eu estava distante. Obrigada por me ajudar a enfrentar meus próprios desafios.

Ao Mark Ciprian pelos ensinamentos e pelo imenso carinho e compreensão. Suas palavras gentis, incentivos e elogios sempre me impulsionaram a continuar e ir além.

A todos os meus amigos por serem, por tantas vezes, o meu ponto de apoio e por me mostrarem que nossos vínculos são muito mais fortes do que qualquer distância física. Vocês me ouviram, me abraçaram e me deram “colo”, me aguentaram mais do que eu mesma e jamais me deixaram sozinha. Agradeço pelos conhecimentos compartilhados, pelas mais diversas ajudas, por todas as risadas e momentos de descontração, pela compreensão, por estarem sempre dispostos a me escutar, por acreditarem em mim e por me impulsionarem a sempre seguir em frente.

Aos meus pais, meu agradecimento especial, pelo amor incondicional, pelas preocupações, por ser minha força nos momentos de fraqueza, pela compreensão e incentivos. Obrigada por proporcionar tudo o que era necessário para que eu pudesse construir o meu próprio caminho, instigar toda a força que estava dentro de mim e me apoiar nas minhas decisões.

Aos meus irmãos por serem meus maiores companheiros, sempre estando dispostos a me ajudar. Obrigada por todo carinho, amor, apoio, conversas, brincadeiras, impicâncias, conselhos e desabafos.

Aos meus tios Eduardo e Eulália juntamente aos meus primos Mateus e Luana, também ao meu irmão Tiago e minha cunhada Ana Elvira, por me receberem com tanto carinho em suas respectivas casas. Muito obrigada pelo acolhimento, apoio nos momentos difíceis, pelas conversas e momentos de descontração. Foi muito reconfortante, divertido e prazeroso poder estar junto de vocês.

A toda minha família por ser meu alicerce, sempre me lembrando da nossa força e união independente das distâncias. Obrigada por compreenderem minhas ausências, me encherem de amor e carinho, me acolherem nos momentos difíceis, vibrarem junto comigo nas alegrias e possibilitarem que eu pudesse chegar ao fim deste trabalho.

Por fim, agradeço a Deus por tudo e todos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar,
mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Lippia alba é uma planta vastamente utilizada pela medicina popular devido as suas características antimicrobianas, antiespasmódicas, anti-inflamatórias, analgésicas, digestivas, entre outras. Conhecida popularmente como “cidreira”, “erva cidreira” entre outros nomes populares, *L. alba* é amplamente utilizada no Brasil e na América do Sul. Possuindo grande variação genética, foram encontrados cinco citótipos de *L. alba* com $2n=30, 38, 45, 60$ e 90 cromossomos. O estudo dessas variações cromossômicas levou a uma proposta de formação de um complexo autoploide a partir de cruzamentos unilaterais e bilaterais de citótipos por meio de gametas reduzidos e/ou não reduzidos. Avanços foram obtidos no que diz respeito ao conhecimento de *L. alba* e diversas abordagens, tais como, análise de dados cariotípicos, citogenéticos, citométricos e moleculares foram empregadas. Para contribuir no estudo da variação biológica da espécie, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, de forma comparativa, o perfil proteômico dos níveis de ploidia descritos para a espécie (diploide, aneuploide, triploide, tetraploide, hexaploide). Para isso, foi realizada a extração de proteínas de folhas de representantes das ploidias citadas, com posterior separação por eletroforese bidimensional, análise de spots e identificação de proteínas por espectrometria de massas. Ao comparar o perfil proteômico do acesso diploide ao perfil dos demais níveis de ploidia, foi possível identificar diferenças de expressão entre os spots analisados. Essas diferenças mostraram-se tanto qualitativas, devido a variações de ausência e presença na expressão dos spots, quanto quantitativas, de acordo com a porcentagem de volume de cada spot. Além disso, foram identificadas 44 proteínas, sendo 27 relacionadas à fotossíntese, 12 relacionadas à energia e metabolismo, 3 chaperonas e 2 proteínas tubulinas de função estrutural. Para cada uma dessas proteínas identificadas, foi possível observar as semelhanças e divergências de expressão entre os níveis de ploidia estudados. As proteínas identificadas possuem papéis relevantes no metabolismo primário de *Lippia alba*. Os dados sugerem, de modo geral, que a alteração no tamanho do genoma não provocou alterações representativas no perfil proteômico observado, à exceção do acesso triploide que apresentou um perfil particular.

Palavras chave: Eletroforese Bidimensional . Proteômica . Poliploidia . Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Lippia alba is a plant vastly utilized in popular medicine due to its antimicrobial, antispasmodic, anti-inflammatory, analgesic and pro-digestive features. It is commonly known in Brazilian Portuguese as “cidreira”, “erva cidreira” along with other popular names and “bushy matgrass” in English. It is widely used in Brazil and South America. The species display large genetic variation, five cytotypes have been described with $2n=30, 38, 45, 60$ and 90 . The study of these chromosomal variations has led to proposing the formation of an autopolyploid complex derived from unilateral and bilateral crossings of cytotypes by reduced and/or non-reduced gametes. There have been advances concerning the knowledge on *L. alba* and on the formation of the polyploid complex. Various approaches have been employed, such as analysis of data generated from karyotyping, cytogenetics, cytometry and molecular genetics. The present work aims at contributing to elucidate the possibility of biological variations by assessing, comparatively, the proteomic profile of the ploidy levels described for the species (diploid, aneuploid, triploid, tetraploid and hexaploid). Protein extraction from leaves has been carried out with posterior dimensional electrophoretic separation. Later, we performed spot analysis and protein identification by mass spectrometry. When comparing the proteomic profile from the diploid sample to the remaining ploidy levels, expression differences were observed between the spots analyzed. The differences showed to be either qualitative, due to the variation in presence of spots, and quantitative, as observed in the volume percentage of each spot. In addition, we identified 44 proteins, being 27 related to photosynthesis, 12 to metabolism and energy, 3 chaperones, and 2 tubulins with structural function. For each of the identified proteins, it was possible to observe similarities and divergences concerning expression amidst the ploidy levels studied. The proteins identified possess relevant roles in primary metabolism of *L. alba*. Our data suggest that alterations in genome size do not provoke representative alterations on the proteomic profile, with the exception of the triploid sample, which displayed a particular profile.

Key words: Two-dimensional electrophoresis . Proteomic . Polyploidy . Mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). | 19 |
| Figura 2 – Perfil de proteínas de folhas de <i>Lippia alba</i> em acessos (a) diploide, (b) aneuploide, (c) triploide, (d) tetraploide e (e) hexaploide. Foi utilizado 1000µg de proteínas para a eletroforese bidimensional. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7 para posterior separação por SDS-PAGE, e assim coradas com azul de coomassie. | 43 |
| Figura 3 – Distribuição percentual das 44 proteínas identificadas em folha de <i>Lippia alba</i> de acordo com suas funções. | 46 |
| Figura 4 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de <i>Lippia alba</i> do acesso diploide. | 55 |
| Figura 5 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de <i>Lippia alba</i> do acesso aneuploide. | 55 |
| Figura 6 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de <i>Lippia alba</i> do acesso triploide. | 56 |
| Figura 7 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de <i>Lippia alba</i> do acesso tetraploide. | 56 |
| Figura 8 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de <i>Lippia alba</i> do acesso hexaploide. | 57 |
| Figura 9 – Expressão comparativa de cinco classes de proteínas entre acesso diploide e aneuploide de <i>Lippia alba</i> | 58 |
| Figura 10 - Expressão comparativa de cinco classes de proteínas entre acesso diploide e triploide de <i>Lippia alba</i> | 59 |
| Figura 11 - Expressão comparativa de cinco classes de proteínas entre acesso diploide e tetraploide de <i>Lippia alba</i> | 60 |
| Figura 12 – Expressão comparativa de cinco classes de proteínas entre acesso diploide e hexaploide de <i>Lippia alba</i> | 61 |

Figura 13 – Análise comparativa de expressão qualitativa das proteínas identificadas de folhas de *Lippia alba* em acessos diploide, aneuploide, triploide, tetraploide, hexaploide. a, b, c e d mostram o número de *spots* presentes em cada ploidia de acordo com a classificação dada às suas proteínas identificadas.62

Figura 14 – Expressão quantitativa diferencial da proteína 2 de 70 kDa (setas) relacionada ao choque térmico respectivamente nos acessos diploide (a), aneuploide (b), triploide (c), tetraploide (d) e hexaploide (e) de *Lippia alba*. Observa-se maior expressão no acesso hexaploide em relação ao diploide.....63

Figura 15 – Expressão qualitativa diferencial da proteína peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) respectivamente nos acessos diploide (a), aneuploide (b), triploide (c), tetraploide (d) e hexaploide (e) de *Lippia alba*. Observou-se a presença do *spot* nos acessos aneuploide, triploide e hexaploide e ausência dos mesmos nos géis duploide e tetraploide.63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Quantidade (μl), correspondente a 1000 μg de proteínas, para cada amostra proteica referente aos acessos (diploide, aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide) de *Lippia alba* e os respectivos volumes de Destreak e tampão IPG. ...34
- Tabela 2 – Valores de absorvância (nm) e concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) das amostras proteicas referentes a cinco acessos de *Lippia alba*: (BGEN-22 diploide), (BGEN-16 aneuploide), (BGEN-23 triploide), (BGEN-31 tetraploide) e (BGEN-42 hexaploide)..
.....41
- Tabela 3 – Expressão qualitativa e quantitativa comparativa entre *spots* do acesso diploide e os demais níveis de ploidia (aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide), considerando razão entre porcentagem de volume maior que 1,5 (ANOVA com $p < 0,05$)45
- Tabela 4 - Proteínas Identificadas em *Lippia alba*, por meio da aquisição de espectros utilizando MALDI TOF/TOF47
- Tabela 5 – Proteínas diferencialmente expressas de *Lippia alba* em comparação ao acesso diploide, considerando ANOVA $p < 0,05$ e FOLD (razão entre as porcentagens de volume) $> 1,5$51
- Tabela 6 – Expressão qualitativa de proteínas identificadas em folhas de *Lippia alba* em cinco níveis de ploidia (diploide, aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide).
.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|-------|--|--|
| ATP | <i>“Adenosine Tri-Phosphate”</i> | Adenosina trifosfato |
| BSA | <i>“Bovine serum albumin”</i> | Albumina de soro bovino |
| CHAPS | <i>“ 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate”</i> | 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-propano sulfonato |
| ESI | <i>“Electrospray ionization”</i> | Ionização por Eletrospray |
| DNA | <i>“Deoxyribonucleic acid”</i> | Ácido desoxirribonucleico |
| DTT | <i>“Dithiothreitol”</i> | Ditiotreitol |
| EDTA | <i>“Ethylenediamine tetraacetic acid”</i> | Ácido etilenodiamino tetraacético |
| HCCA | <i>“α-cyano-4-hydroxycinnamic acid”</i> | Ácido aciano-4-hidroxicinâmico |
| HCl | <i>“Hydrochloride”</i> | Ácido clorídrico |
| IEF | <i>“Isoelectric focusing”</i> | “Focalização isoeletrica” |
| IPG | <i>“Immobilized pH gel”</i> | “Gradiente de pH imobilizado” |
| IRSS | <i>“Inter simple sequence repeat”</i> | Sequências simples repetidas |
| KCl | <i>“Potassium chloride”</i> | Cloreto de Potássio |
| MALDI | <i>“Matrix-assisted laser desorption/ionization”</i> | Ionização e dessorção a laser assistida por matriz |
| MEP | <i>“2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate”</i> | 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato |

| | | |
|---------|---|---------------------------------------|
| mRNA | <i>"messenger Ribonucleic acid"</i> | Ácido ribonucleico mensageiro |
| MS | <i>"Mass spectrometry"</i> | Espectrometria de massa |
| PAGE | <i>"PolyAcrylamide Gel Electrophoresis"</i> | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| PMSF | <i>"Phenylmethane sulfonyl fluoride"</i> | Fluoreto de fenilmetanossulfonilo |
| RAPD | <i>"Random amplified polymorphic DNA"</i> | DNA polimórfico amplificado ao acaso |
| Rubisco | <i>"Ribulose bisphosphate carboxylase"</i> | Ribulose bifosfato carboxilase |
| TEMED | <i>"Tetramethylethylenediamine"</i> | Tetrametiletilenodiamina |
| TOF | <i>"Time-of-flight"</i> | Tempo de voo |
| TRIS | <i>"(hydroxymethyl)aminomethane"</i> | (hidroximetil)aminometano |
| SDS | <i>"Sodium Dodecyl Sulfate"</i> | Dodecil-sulfato de sódio |
| 2D | - | Eletroforese bidimensional |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 1.1 | <i>Lippia alba</i> : TAXONOMIA, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA | 18 |
| 1.2 | <i>Lippia alba</i> : CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA..... | 20 |
| 1.3 | PROTEÔMICA E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O ENTENDIMENTO DO COMPLEXO <i>Lippia alba</i> | 21 |
| 1.4 | ESTUDO PROTEÔMICO DE PLANTAS MODELO, CULTIVADAS E NÃO CULTIVADAS | 22 |
| 1.5 | APLICAÇÕES DA PROTEÔMICA EM PLANTAS..... | 24 |
| 1.5.1 | PROTEÔMICA DE ALIMENTOS..... | 24 |
| 1.5.2 | PLANTAS MEDICINAIS..... | 25 |
| 1.5.5 | PROTEÔMICA DE POLIPLOIDES | 26 |
| 2 | OBJETIVO | 31 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 3.1 | MATERIAL BIOLÓGICO | 32 |
| 3.2 | EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS..... | 32 |
| 3.3 | QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS..... | 33 |
| 3.4 | SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-SDS-PAGE) | 33 |
| 3.5 | COLORAÇÃO DOS GÉIS POR COOMASSIE BLUE | 36 |
| 3.6 | EXTRAÇÃO PEPTÍDICA..... | 36 |
| 3.7 | ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS | 37 |
| 3.8 | ESPECTROMETRIA DE MASSAS | 38 |
| 3.9 | IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS | 39 |
| 4 | RESULTADOS | 40 |
| 4.1 | QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS..... | 40 |
| 4.2 | SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-SDS-PAGE) | 42 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.3 | ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS | 44 |
| 4.4 | PROTEÍNAS IDENTIFICADAS | 45 |
| 4.5 | ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS | 50 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 64 |
| 6 | CONCLUSÃO | 70 |
| 7 | PERSPECTIVAS | 71 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Lippia alba*: TAXONOMIA, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A família Verbenaceae compreende cerca de 175 gêneros e 2800 espécies observadas principalmente nos neotrópicos, mas algumas espécies são também encontradas em regiões temperadas (BLANK et al., 2015). Seu segundo maior gênero, *Lippia*, inclui cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores distribuídas pela América do Sul, América Central e África tropical (SOUSA et al., 2013). Segundo Viccini (2006), o Brasil detém uma grande diversidade de espécie do gênero *Lippia*, possuindo cerca de 70 a 75% das espécies descritas.

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) é a espécie mais estudada do gênero *Lippia*, sendo uma planta nativa da América do Sul, com ampla distribuição geográfica em áreas tropicais (ROBERTSON e CHAN, 2011; HUGHES et al., 2013). *Lippia alba* é uma espécie arbustiva que atinge até dois metros de altura, com poucos ramos e folhas opostas com aroma agradável (GIBSON, 1970) (Figura 1). No Brasil, pode ser encontrada em qualquer uma de suas cinco regiões geográficas (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste), estando presente nos biomas de Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e da Amazônia (REFLORA-HERBÁRIO VIRTUAL, 2017). A região Centro-Oeste, caracterizada pelo bioma do Cerrado, é aquela que até o momento revelou a maior diversidade genotípica da espécie (REIS et al., 2014).

Conhecida popularmente, no Brasil e na América do Sul, como “cidreira”, “erva cidreira” entre outros nomes (VICCINI et al., 2014), *L. alba* é amplamente utilizada pela medicina popular devido às suas características antimicrobianas, antiespasmódicas, anti-inflamatórias, analgésicas, digestivas, entre outras (MONTERO-VILLEGAS et al., 2017). Infusões e decocções de suas folhas são consumidas como bebidas aromáticas e agradáveis (TIMÓTEO et al., 2014).



Figura 1 - *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).

Lippia alba é uma espécie promissora para a indústria farmacêutica devido à comprovação de suas atividades biológicas (LIMA et al., 2016). Além disso, a espécie, também, é visada pela indústria de cosméticos, devido ao seu aroma, e pela indústria agrícola, devido suas propriedades antifúngicas, inseticidas e repelentes (BLANK et al., 2015).

Exibindo grande diversidade morfológica e química, as análises fitoquímicas dessa espécie vegetal permitiram a identificação de alcaloides, esteroides, taninos, flavonoides, cumarinas e terpenos (GOMES et al., 2016). Os terpenos, presentes em seus óleos essenciais, são, no entanto, os metabólitos secundários que tem obtido maior atenção, devido suas características farmacológicas (ROCHA et al., 2015).

Os estudos de seus óleos essenciais vêm sendo realizados por métodos convencionais de análises. Em geral, é realizada a extração a partir de técnica de arraste a vapor seguida por análise em cromatografia gasosa, na maioria dos casos, acoplada a espectrometria de massas (HENNEBELLE et al., 2008). A utilização dessa técnica permite a extração dos óleos essenciais, seguida da identificação dos seus componentes (em sua maioria terpenos). Diversas análises químicas, biológicas e farmacológicas, como ensaios antimicrobianos e antifúngicos, têm sido assim realizadas para maior compreensão da atividade e da composição desses componentes (GLAMOCLIJA et al., 2011).

1.2 *Lippia alba*: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Os óleos essenciais extraídos das folhas de *L. alba* possuem alta variabilidade química, qualitativa e quantitativa, que pode estar relacionada com a origem geográfica da planta, sendo nesse caso resultado de sua ampla plasticidade fenotípica (MONTERO-VILLEGAS et al., 2017). De acordo com a constituição química dos óleos essenciais, referente à porcentagem de seus componentes identificados, pode ser realizada uma separação entre diferentes quimiotipos. Esses quimiotipos podem ser classificados, em três grandes grupos, de acordo com a porcentagem encontrada de citral, linalol e carvona (TIMÓTEO et al., 2014).

Essa variabilidade química pode estar, também, relacionada com a variabilidade genética dos acessos. Para poder avaliar a variabilidade genética, Manica-Cattani et al. (2009) observaram que técnicas de identificação rápida e precisa de genótipos eram necessárias. Por isso, avaliou-se a eficiência dos marcadores *Inter simple sequence repeat* (ISSR) e *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) para identificação de genótipos de *L. alba*. Além destes, marcadores moleculares do tipo microssatélites, também foram desenvolvidos em *L. alba* por sua ampla cobertura do genoma, codominância e natureza multi-alélica, permitindo estudos taxonômicos, filogenéticos, além dos de variabilidade genética (SANTOS et al., 2012; ROCHA et al., 2015). Maior relação entre a variabilidade química e a variabilidade genética de óleos essenciais pode ser vista no estudo de Viccini et al. (2014). Nesse estudo, foi observada a diferença na composição química dos principais componentes de óleos essenciais, em acessos de *L. alba* mantidos sob idênticas condições ambientais. Observou-se, ainda, a existência de uma associação direta entre as diferenças de constituição química identificadas nos óleos essenciais e os níveis de ploidia dos acessos analisados.

As variações genômicas presentes entre os quimiotipos já haviam sido reportadas, por Pierre et al. (2011) que utilizaram ferramentas citogenéticas, citométricas e moleculares para compreender as diferenças genéticas entre três quimiotipos de *L. alba*. Suas análises revelaram que além das composições químicas diferentes, os quimiotipos também diferiam nas constituições cromossômicas, comportamentos reprodutivos, conteúdos de DNA e perfis de

marcadores moleculares. Este foi o primeiro relato de acessos com diferentes números cromossômicos (citótipos) em *L. alba* ($2n=30$; $2n=60$ e $2n=12-60$). Posteriormente, Reis et al. (2014) utilizaram técnicas citogenéticas e análise de viabilidade de pólen para a caracterização cromossômica de 106 acessos de *L. alba*. Cinco números cromossômicos ($2n=30$, 38, 45, 60 e 90) foram observados com quantidades de DNA proporcionais aos números observados. A análise estrutural dos cromossomos, utilizando mapeamento físico do DNA ribossomal por 5S e 45S, juntamente com as variações de tamanho do genoma permitiram a proposição da formação de poliploidia em *L. alba* por eventos de hibridação e duplicação do genoma. De acordo com esses resultados, Reis et al. (2014) propuseram que esse complexo poderia ter sido formado, através da sequência de cruzamentos entre seus citótipos, envolvendo indivíduos com menor número de cromossomos, diploides ($2n = 30$), para gerar os demais citótipos ($2n = 38, 45, 60$ e 90).

Essa proposta de formação de um complexo autopoliploide, a partir de cruzamentos unilaterais e bilaterais de citótipos com seus gametas reduzidos e/ou não reduzidos, foi reforçada por Reis et al.(2016) ao observar alta frequência de citomixia em indivíduos tetraploides de *L. alba*. A citomixia é um mecanismo potencial para gerar instabilidade meiótica e a formação de gametas não reduzidos ou desequilibrados, podendo, assim, contribuir para a formação de aneuploides e poliploides, assim como um melhor entendimento da origem dos citótipos e formação do complexo autopoliploide em *L.alba* (REIS et al., 2016).

1.3 PROTEÔMICA E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O ENTENDIMENTO DO COMPLEXO *Lippia alba*

A poliploidia é capaz de provocar mudanças tanto na estrutura genômica como na expressão gênica dos indivíduos poliploides. Isso pode ser devido à necessidade dos poliploides de balancear a expressão múltipla de seus genes duplicados como forma de garantir o funcionamento celular adequado (YOO et al., 2014). Esses mecanismos estruturais e de expressão gênica são, então, refletidos nos fenótipos dos indivíduos poliploides, sendo responsáveis pela manifestação de

suas características anatômicas, morfológicas e fisiológicas (WANG et al., 2013). Essas mudanças obtidas nas funções biológicas dos poliploides estão altamente relacionadas com a atividade de suas proteínas. Porém, devido à diversidade existente dos mecanismos envolvendo a expressão gênica, não é possível estabelecer uma relação linear entre os genes e o complemento proteico presente nas células (PANDEY e MAN, 2000).

A proteômica visa a identificação de proteínas e de suas funções; os estudos de interações proteína-proteína; o entendimento de mecanismos bioquímicos e redes regulatórias; a compreensão de expressões de perfis proteicos e as avaliações de modificações pós-traducionais, entre outros elementos, que podem ser analisados em diferentes condições ambientais (AHMAD et al., 2016).

Dessa forma, a aplicação de análises proteômicas permite a associação entre as variações genômicas presentes em diferentes citótipos e a análise de suas possíveis consequências na variação de expressão de proteínas (SHENA et al., 2015). Portanto, a proteômica mostra-se como uma excelente abordagem para a obtenção de respostas sobre questionamentos ainda existentes em relação às variações biológicas decorrentes da variação genética no complexo poliploide *L. alba*.

1.4 ESTUDO PROTEÔMICO DE PLANTAS MODELO, CULTIVADAS E NÃO CULTIVADAS

A aplicação de macro abordagens em plantas (genômica, proteômica, transcriptômica, metabolômica), foi iniciada no século 21 com estudos em plantas modelo (CHAMPAGNE e BOUTRY, 2016). O início do estudo com plantas modelo na proteômica ocorreu, pois para que haja confiabilidade da identificação das proteínas é necessário que o genoma do organismo seja sequenciado ou que haja um número suficiente de sequências disponíveis (JORRÍN-NOVO et al., 2015). Dessa forma, a disponibilidade das sequências genômicas dos organismos modelo permitiram a implementação da proteômica em plantas (FUKAO, 2012). Os primeiros estudos proteômicos foram realizados, portanto, com as espécies *Arabidopsis*

thalianae e *Oryza sativa* por possuírem seu genoma sequenciado (CHAMPAGNE e BOUTRY, 2013). Posteriormente, foi obtido o genoma de outras espécies como *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Populus trichocarpa*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera*, *Zea mays*, *Brachypodium distachyon*, *Lotus japonicas*, *Hordeum vulgare* e *Triticum aestivum* (REMMERIE et al., 2011; HU et al., 2015).

Nos últimos anos, os esforços passaram a ser realizados para que haja maior aplicação da proteômica em plantas cultivadas (FUKAO, 2012). Para isso, os sequenciamentos de plantas cultivadas como batata, milho e tomate foram realizados e adicionados em base de dados públicos. Embora as informações genômicas dessas plantas ainda sejam limitadas, a disponibilidade dessas informações permitiu avanços em estudos de plantas cultivadas (HU et al., 2015). O interesse da aplicação da proteômica nessas plantas se dá por vários motivos tais como a capacidade de melhorar a tolerância das plantações a fatores de estresse, permitindo maior estabilidade na produção agrícola; contribuição para o aumento do valor nutricional; otimização da segurança alimentar; e promoção de desenvolvimento sustentável das matérias primas para produção de biocombustíveis (VANDERSCHUREN et al., 2013).

Nesse contexto, estudos proteômicos de espécies de plantas não cultivadas, que possuem baixo valor econômico, e não modelo mostram-se raros (JORRÍN-NOVO et al, 2015). Estudos realizados com essas espécies são mais desafiadores devido à falta de caracterizações moleculares abrangentes; poucas sequências de proteínas disponíveis em bancos de dados; e maiores dificuldades experimentais, sendo por vezes necessárias adaptações de protocolos e métodos (FUKAO, 2012). Dessa forma, diversas plantas deixam de ser estudadas apesar de seus valores ambientais e por vezes medicinais. Esses organismos possuem funções particulares no ecossistema. Seus estudos são, portanto, importantes uma vez que ao diferirem dos modelos atuais, permitem a compreensão da diversidade presente no reino vegetal (ARMENGAUD et al., 2014).

1.5 APLICAÇÕES DA PROTEÔMICA EM PLANTAS

A aplicação da proteômica em estudos com plantas possibilita maior compreensão da biologia vegetal (NARULA et al., 2015). Isso tem sido comprovado em diversos estudos celulares e subcelulares; estruturais e de desenvolvimento; além de fisiológicos e genéticos (HAKEEM et al., 2012). Porém, esses estudos proteômicos têm se estendido para além de identificações simples de proteínas, suas quantificações, localizações e interações (HU et al., 2015). Os estudos proteômicos de plantas têm buscado abordar questões mais amplas, como as relacionadas a agricultura, medicina, biologia evolutiva, sustentabilidade ecológica, biocombustíveis, rastreabilidade alimentar, valor nutricional e identificação de alérgenos (GEMPERLINE, KELLER e LI, 2016; AHSAN et al., 2016). A seguir detalharemos um pouco mais sobre estudos relacionados à proteômica como ferramenta na identificação da composição de alimentos, de plantas medicinais e também como ferramenta para o estudo de poliploides, uma vez que, nosso modelo de estudo, *Lippia alba*, é um poliploide, consumido popularmente em forma de bebidas (chás) agradáveis e possui propriedades medicinais conhecidas.

1.5.1 PROTEÔMICA DE ALIMENTOS

A proteômica em plantas permite a análise de valores nutricionais de alimentos cultivados, mostrando-se de grande utilidade para a garantia da autenticidade alimentar, a partir de biomarcadores de proteínas sensíveis, aumentando a segurança e a rastreabilidade de ingredientes alimentares (ELDAKAK et al., 2013). A análise proteômica permite, assim, a identificação de potenciais contaminantes proteicos, como proteínas traduzidas por genes de plantas transgênicas que possuem comercialização ilegal em alguns países. É possível também detectar proteínas em produtos alimentares que compreendem extratos de

plantas, podendo conferir assim a autenticidade desses produtos (RIGHETTI e BOSCHETTI, 2016).

Avanços também foram obtidos na aplicação de estudos proteômicos para detecção e quantificação de alérgenos presentes em plantas utilizadas para consumo humano (HUSCHEK et al., 2016). Os estudos mostram que a variabilidade da expressão dos alérgenos em plantas, resulta tanto dos genes quanto das variações ambientais sofridas, assim como das práticas de agricultura empregadas. Além disso, foi possível observar que os alérgenos apresentam-se em quantidades diferentes de acordo com os tecidos analisados. As mudanças a serem tomadas com base nessas constatações são muito importantes, pois a possibilidade de se obter, mesmo que pequenas alterações dos níveis de alérgenos, diminuindo sua presença em plantas utilizadas para consumo humano, podem levar a importantes variações na alergenicidade expressa pelos pacientes alérgicos (AHSAN et al., 2016).

1.5.2 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais pela população para o tratamento de doenças é uma prática comum desde antes da era Cristã (DUTRA et al., 2016). Segundo Romero-Benavides et al. (2017) “aproximadamente 80% da população mundial recorre ao uso de plantas medicinais para os primeiros cuidados de saúde” e “25% das prescrições médicas são derivadas direta ou indiretamente de plantas”. Esses efeitos benéficos das plantas medicinais resultam da combinação de seus metabólitos secundários, sendo essas substâncias produzidas, como forma de proteção, pelas plantas quando em condições de estresse (BARBOZA et al., 2009).

A aplicação da proteômica em plantas medicinais é uma poderosa ferramenta para determinar as substâncias responsáveis pelas propriedades medicinais obtidas pelo metabolismo secundário das plantas. Além disso, permite a compreensão de rotas biossintéticas correlacionadas à produção dessas substâncias (MARTINEZ-ESTESO et al., 2015).

A identificação de compostos de plantas medicinais, por meio de estudos proteômicos, podem ser vistos em estudos como o de Bryant et al. (2016) que através de análises de dados identificaram e classificaram os compostos observados, em folhas e tricomas, de *Artemisia annua* através de sua análise proteômica. Por outro lado, a compreensão das variações existentes na produção desses componentes pode ser vista em estudos como os de Kim et al. (2016) que avaliaram o potencial medicinal dos frutos de *Panax ginseng* através de técnicas de proteômica e metabolômica, o que tornou possível identificar que os frutos de *P. ginseng* são ricos em compostos medicinais e não só as raízes, como tradicionalmente se é conhecido. Além disso, a aplicação da proteômica em estudos com plantas medicinais tem permitido estabelecer correlações entre os fatores de estresse e a produção dos metabólitos secundários com efeitos medicinais (AGHAEI e KOMATSU, 2013) potencializando maior controle de qualidade na produção das substâncias medicinais de interesse. Outro exemplo pode ser observado no estudo de Zheng et al. (2015) que ao analisarem mudas de *Ginkgo biloba* verificaram que a radiação UVB aumenta significativamente o conteúdo ativo de flavonoides, que são um de seus principais componentes bioativos. O uso da radiação levou também a uma diminuição da quantidade de ácido ginkólico tóxico que possui fortes propriedades alergênicas.

1.5.5 PROTEÔMICA DE POLIPLOIDES

A poliploidia é caracterizada pela presença de mais de dois conjuntos de cromossomos em um núcleo (ZHANG et al., 2016). É um fenômeno vastamente observado em plantas, com importantes consequências ecológicas e evolutivas, sendo um dos principais mecanismos de especiação em plantas. Amplamente observado no reino vegetal, reconhece-se que a poliploidia tenha ocorrido em algum ponto da ascendência de todas as plantas com flores e que continua a ser um processo evolutivo e ecológico ativo em muitas linhagens (GALLACHER et al., 2016). A poliploidia pode ser observada em diversas plantas cultivadas como: batata, algodão, banana, alfafa e trigo (ALBERTIN et al., 2005; MENG et al, 2016).

Os poliploides podem ser classificados, de forma geral, como autopoliploides (o genoma duplicado provém da mesma espécie) ou alopoliploides (o genoma duplicado provém de espécies diferentes, ocorrendo hibridização interespecífica) (LOYD e BOMBLIES, 2016).

Essas duplicações genômicas, possuem impactos no rearranjo cromossômico, alargamento nuclear e em mudanças epigenéticas, causando efeitos consideráveis na expressão gênica e na abundância de proteínas. A poliploidização fornece material genético abundante para a neofuncionalização, proporcionando grande variação genética e possui, por isso, grande importância em mecanismos evolutivos (WANG et al., 2016 e ZHANG et al., 2016). Além disso, as variações genéticas podem levar a diferenças morfológicas, fisiológicas e citológicas. Isso pode afetar diversas características como tamanho celular, peso da planta, taxa de crescimento, tempo de floração e fertilidade (WANG et al., 2016). Plantas poliploides geralmente possuem folhas mais largas e frutos maiores. Além disso, alguns poliploides possuem maior tolerância a estresses ambientais como seca, calor e salinidade. Essas características os tornam atraentes para a agricultura e podem ser atribuídas à expressão gênica dos genes duplicados ou, simplesmente, ser relacionada aos mecanismos de evolução (WANG et al., 2017, MENG et al., 2016).

O estudo de plantas poliploides, suas características e de seus mecanismos de regulação passaram a ser alvo de interesse nas últimas décadas. Nesse contexto, a proteômica mostrou-se, nos últimos anos, uma importante ferramenta para o estudo de poliploides. Tal fato pode ser compreendido, uma vez que as análises do proteoma permitem maior relação com os fenótipos expressos e complementam as informações geradas pelos dados genômicos e transcriptômicos (AN et al., 2014; WANG et al., 2017).

As análises proteômicas realizadas até o momento, em plantas poliploides, tem ocorrido devido a interesses tanto evolutivos quanto agrícolas. De acordo com essas finalidades, os estudos abrangem análises de seus proteomas; comparação desses com os proteomas dos parentais; análise proteômica de suas respostas a mecanismos de estresse; e avaliações de melhores poliploides para cultivo (SOLTIS et al., 2016).

Estudos de análise de proteomas podem ser exemplificados por estudos com o de Wang et al. (2016) que ao analisar proteínas de arroz observaram alterações significativas em proteínas relacionadas com a fotossíntese e com rotas

metabólicas entre indivíduos diploide e triploides (autopoliplóides). Essas alterações de proteínas nem sempre, porém, ocorrem em autopoliplóides como foi visto por Albertin et al. (2005) que identificaram alterações muito pequenas de expressão em folhas e caules de *Brassica oleracea* autotetraploides.

Já no que diz respeito à comparação do proteoma de poliplóides com seus parentais, podemos observar que em muitos estudos de alopoliplóides têm sido relatadas expressões enviesadas em relação aos genomas parentais. Hu et al. (2011), ao analisarem sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) alopoliplóide observaram uma expressão desigual de proteínas providas do genoma parental diploide, notando-se um acúmulo de proteínas de forma enviesada, mais semelhante a um de seus progenitores. Além disso, observou-se que 64,1% das proteínas da semente mostraram padrões aditivos de expressão enquanto 35,6% mostraram padrões não aditivos. A presença de padrões não aditivos de expressão tem sido observada em outros estudos de poliplóides como no caso de *Brassica*. Observou-se, em folhas de hexaploides, um padrão não aditivo em 100 proteínas relacionadas com a biogênese, respostas a estímulo e imunidade (Shen et al., 2015). Como consequência os autores propuseram que esse padrão não aditivo provavelmente seria um ponto forte para variação e adaptação em alopoliplóides (Shen et al., 2016). Essa idéia também foi considerada em indivíduos autopoliplóides no trabalho de Dong et al. (2016) que ao observarem 198 proteínas não aditivas em autotetraploides de *Paulownia australis* propuseram também que esse padrão pode promover variação e adaptação em autopoliplóides. Os autores argumentam ainda que “as proteínas envolvidas em modificações pós-traducionais, enovelamento proteico e resposta a estímulos foram significativamente enriquecidas entre padrões não aditivos”.

No que diz respeito a indivíduos autopoliplóides e alopoliplóides, os estudos de Ng et al. (2012) permitem uma observação conjunta dos efeitos no proteoma de *Arabidopsis*. Nesse estudo foram reportadas variações quantitativas na análise de proteínas em folhas de *Arabidopsis*. Foi identificada uma diferença de 8% entre diploides de *A. thaliana* e seus autotetraploides e de 8,3 e 8,2% entre alotetraploides e seus parentais. Além disso, foram também identificadas diferenças em proteínas relacionadas a fatores de estresse entre diploides e autotetraploides da espécie. Os dados sugerem um aumento da divergência de proteínas entre as

ploidias e rápidas mudanças na regulação pós-traducionais de proteínas durante a poliploidização.

Por fim, no que diz respeito à análise proteômica de respostas dos poliploides a mecanismos de estresse e avaliações dos melhores poliploides para cultivo, podemos citar os estudos como os de An et al. (2014). Os autores verificaram aumento da expressão de proteínas relacionadas à fotossíntese e resistência à ambientes salinos em tetraploides de *Manihot esculenta* quando os mesmos foram comparados comparadas aos diploides. O resultado sugere melhor adaptação de indivíduos tetraploides e a possibilidade de implementação de estratégias de melhoramento.

Diferenças entre indivíduos diploides e autotetraploides também foram verificadas em *Robinia pseudocacia* (Meng et al., 2016). Neste estudo, observou-se aumento no acúmulo de H₂O₂, dos níveis de importantes enzimas antioxidantes, e de antioxidantes não enzimáticos, em tetraploides, quando comparados aos diploides sob estresse salino. Essa informação pode ser usada para o melhoramento de tolerância salina em plantas.

Zhang et al. (2016), por outro lado, analisaram proteínas de grãos de pólen de *Populus deltoides* e verificaram que proteínas alergênicas eram menos expressas em pólen de triploides, sugerindo a possibilidade do cultivo de triploides como forma de diminuir a alergenicidade do pólen.

Wang et al. (2017) por sua vez, ao analisarem indivíduos diploides e tetraploides de *Paulownia australis*, observaram que a abundância de proteínas relacionadas à divisão celular, ao metabolismo de glutathiona e à síntese de celulose, clorofila e lignina mostraram-se diferentes e mais abundantes em plantas autotetraploides em comparação as diploides. O resultado permitiu clarear a base molecular das características de predominância em autotetraploide e abrir novas possibilidades para o melhoramento de plantas.

De forma geral, apesar da implementação da proteômica ter trazido novas informações sobre plantas poliploides, podemos observar que “a compreensão das consequências da poliploidia no proteoma permanece em sua infância” (Soltis et al., 2016). Isso se explica devido aos estudos realizados ainda envolverem um número limitado de proteínas, tornando difícil a extrapolação para o proteoma de poliploides como um todo. Além do mais, o foco de estudo proteômico tem sido maior em

plantas cultivadas deixando uma lacuna em materiais não modelo e/ou não cultivados.

No presente estudo, investigamos e validamos as mudanças nos padrões do proteoma entre genótipos poliploides de *L. alba* comparados ao acesso diploide por meio da separação bidimensional das proteínas seguida de análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS/MS combinado a 2-DE). Todas as proteínas diferenciais foram agrupadas em grupos coesos com base em suas funções bioquímicas. Nossos dados permitiram identificar um conjunto de proteínas diferencialmente expressas em *L. alba* contribuindo para entender o processo de poliploidização em *L. alba* e sua consequência para os principais processos fisiológicos, de desenvolvimento e suas rotas biossintéticas.

2 OBJETIVO

Comparar o perfil proteico de um conjunto de acessos representantes dos cinco níveis de ploidia descritos para *Lippia alba* (aneuploide, triploide, tetraploide, hexaploide) tendo como referência o perfil do acesso diploide.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair proteínas totais de folhas de *Lippia alba* dos acessos dos cinco níveis de ploidia descritos para a espécie (aneuploide, diploide, triploide, tetraploide, hexaploide);
- Separar as proteínas totais em frações simples por eletroforese bidimensional;
- Realizar análise comparativa de expressão dos *spots* referentes a acessos representantes dos cinco níveis de ploidia pelo *software* ImageMaster 2D Platinum 7.0;
- Analisar as proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas;
- Identificar as proteínas, a partir dos espectros obtidos, por bioinformática.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram avaliados cinco acessos representantes de cada nível de ploidia em *Lippia alba*: (BGEN-16, aneuploide), (BGEN-22, diploide), (BGEN-23, triploide), (BGEN-31, tetraploide) e (BGEN-42, hexaploide). Os acessos foram escolhidos em função da qualidade e quantidade de material biológico disponível. Exemplares vouchers de cada acesso estão depositados no Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os acessos foram mantidos em casa de vegetação na Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora (21°41'31"S 43°26'15"W, 678 m altitude), sob condições controladas de cultivo, para que fosse possível comparar o perfil de expressão proteica. Os acessos permaneceram sob luz natural, $\pm 28^{\circ}\text{C}$, irrigadas por um *sprinkler* aéreo uma vez por dia durante 15 min.

Os genótipos selecionados foram clonados e podados para uniformizar a idade das folhas a serem coletadas. As primeiras folhas, que emergiram após a poda e tiveram o limbo completamente expandido foram coletadas para as análises.

3.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Proteínas de folhas de *L. alba* foram extraídas segundo o protocolo de Carpentier et al. (2005). A extração foi realizada em triplicada, totalizando 15 amostras. Para tanto, 200 a 230mg de tecido foliar foram obtidos por maceração em nitrogênio líquido. Adicionou-se 750 μL de tampão de extração gelado (Tris HCL pH 8,5, 50mM, EDTA 5mM, KCl 100mM, DTT 1%, Sacarose 30% e PMSF 2mM). A mistura foi recolhida em microtubos. À mistura foram adicionados 750 μL de fenol tamponado pH 8,0 (Sigma) que em seguida foi agitado (termomixer) por 15 minutos,

a 4°C e 1200 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6000g por três minutos a 4°C. Recuperou-se a fase fenólica na qual se adicionou quatro volumes de metanol com acetato de amônio 0,1M. A precipitação foi realizada durante toda a noite a -20°C. Em seguida o material foi centrifugado a 16.000g por 15 minutos. O *pellet* foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 150µL de tampão de amostra (uréia 4M, tiouréia 2M e chaps 4% (3-[(3-Cholamidopropyl)]). O *pellet* foi então agitado (termomixer) por uma hora à temperatura ambiente.

As amostras foram sonicadas utilizando o aparelho UltraSonic Processor (Modelo GE 50) (amplitude de 70dB) em pulso de 10 segundos (amplitude 20% por três vezes), seguidas por pulso de 10 segundos (amplitude 30% por três vezes) e finalmente pulsos de 10 segundos (amplitude 40%) até as amostras ficarem translúcidas.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), a partir da curva de concentração de albumina de soro bovino (BSA), e a absorvância foi verificada em espectrofotômetro a 595nm (Apêndice A).

3.4 SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-SDS-PAGE)

Para a primeira dimensão (separação por ponto isoelétrico) foram utilizadas tiras de tampão Immobiline pH 4-7, 18 cm. A reidratação foi realizada no IPG BOX (GE Healthcare) em um período de 20 horas. Para a reidratação, cada tira foi imersa em um volume de 340µL contendo uma solução de reidratação Destreak (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2% (m/v), azul de bromofenol 0.002% (m/v),

ditiotretol (DTT) 0,2% (m/v)), tampão IPG 2,5% e tampão de amostra contendo 1000µg de proteínas (Handbook-GE Healthcare, 2004). As quantidades de cada amostra proteica e seus respectivos volumes de tampão IPG e Destreak estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1–Quantidade (µl), correspondente a 1000 µg de proteínas, para cada amostra proteica referente aos acessos (diploide, aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide) de *Lippia alba* e os respectivos volumes de Destreak e tampão IPG.

| Amostra | | 1000 µg (µl de amostra) | Destreak | IPG | Vfinal (µL) |
|-----------------------|----|----------------------------|----------|-----|-------------|
| (BGEN-22 diploide) | 1 | 43,38 | 289,82 | 6,8 | 340 |
| | 2 | 36,38 | 296,82 | 6,8 | 340 |
| | 3 | 44,58 | 288,62 | 6,8 | 340 |
| (BGEN-16 aneuploide) | 4 | 87,53 | 254,67 | 6,8 | 340 |
| | 5 | 72,62 | 260,58 | 6,8 | 340 |
| | 6 | 48,47 | 284,73 | 6,8 | 340 |
| (BGEN-23 triploide) | 7 | 64,13 | 269,07 | 6,8 | 340 |
| | 8 | 59,10 | 274,10 | 6,8 | 340 |
| | 9 | 87,99 | 245,21 | 6,8 | 340 |
| (BGEN-31 tetraploide) | 10 | 35,00 | 298,20 | 6,8 | 340 |
| | 11 | 45,06 | 288,14 | 6,8 | 340 |
| | 12 | 49,19 | 284,01 | 6,8 | 340 |
| (BGEN-42 hexaploide) | 13 | 74,74 | 258,46 | 6,8 | 340 |
| | 14 | 59,80 | 273,40 | 6,8 | 340 |
| | 15 | 42,79 | 290,41 | 6,8 | 340 |

A focalização isoelétrica (IEF) foi realizada a temperatura constante de 20°C no sistema de eletroforese IPGphor III (GE Healthcare). A corrida eletroforética para a primeira dimensão foi realizada segundo o Handbooks GE Healthcare, 2004. Em uma etapa inicial foi utilizado 200V por uma hora, seguido por 500V por duas horas, 800Vh em gradiente até 1000V; 11300Vh em gradiente até 8000 V; 12000Vh em passo único de 8000 V; e, por fim, 5000V final até a retirada das tiras. Após o IEF, as tiras foram armazenadas a -80°C até o momento da segunda etapa da eletroforese bidimensional.

As tiras foram equilibradas em 10mL de tampão de equilíbrio (Tris- HCl 75 mM, pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 29,3% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v)). Foram realizadas duas etapas de equilíbrio, para reduzir e alquilar as proteínas. As fitas foram imersas sob agitação lenta, primeiramente em 10mL de tampão de equilíbrio com 180mg de dithiothreitol (DTT) (para redução das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína) por 30min, e em seguida, imersas em 10 mL de tampão de equilíbrio com 430mg de iodoacetamida por mais 30min (para alquilação dos enxofres) (Handbooks GE Healthcare, 2004).

A segunda dimensão da eletroforese das proteínas presentes nas tiras IPG foi realizada em gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS (SDS-PAGE) (acrilamida- bisacrilamida (30:0,8), tampão Tris-HCl pH 8,8, 1,5M, SDS 10%, água deionizada, persulfato de amônio 10%, TEMED) . Juntamente à tira, foi inserido um gel de agarose 0,1% (tampão decorrida 1X, agarose 0,5%, azul de bromofenol 1%).

A corrida foi realizada em cuba DaltSix (GE Healthcare) a 10 mA/gel por 45 minutos, e em seguida a 40 mA/gel até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. A cuba DaltSix possui um compartimento inferior no qual se colocou tampão de corrida 1X (Tris Base 25 mM, Glicina pH 8,3, 0,25M, SDS 1% e água MilliQ) e um compartimento superior no qual se colocou tampão de corrida 2X. A cuba foi ligada a um banho termostato a 10°C para resfriar o tampão.

3.5 COLORAÇÃO DOS GÉIS POR COOMASSIE BLUE

Após a corrida SDS-PAGE, os géis foram lavados com água MilliQ e incubados sob agitação por 24 horas em solução de fixação (ácido acético 10% e etanol 40%). Em seguida, os géis foram lavados novamente com água MilliQ e incubados sob agitação em solução corante (Coomassie Blue G-250 40% e metanol 10%) por três dias. Após terminar a etapa de coloração, os géis foram lavados em solução de ácido acético 5% e mantidos imersos nessa mesma solução até a retirada dos *spots*. Foram retirados *spots* que possuíam diferenças qualitativas ou quantitativas (de acordo com o tópico 3.7 a seguir), na comparação dos *spots* oriundos do acesso diploide com os *spots* observados nos demais níveis de ploidia.

3.6 EXTRAÇÃO PEPTÍDICA

Os *spots* excisados dos géis foram transferidos para microtubos de 0,6 mL e digeridos com a enzima tripsina (Trypsin gold, mass spectrometry grade, Promega). A digestão foi realizada segundo protocolo de digestão trípica estabelecido por Shevchenko (Shevchenko et al., 2006), onde os pedaços de géis excisados são descorados em três lavagens com solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0. Após a segunda lavagem, as amostras foram mantidas *overnight* sob agitação constante, e por último foi realizada uma terceira lavagem. A acetonitrila foi removida e o gel foi desidratado com 200 μ L de acetonitrila (100%). Removeu-se a acetonitrila e os géis foram secos no vácuo por 15 minutos. Os pedaços de gel foram reduzidos em 100 μ L de DTT 65 mM por 30 minutos, à temperatura de 56°C. Posteriormente, esses mesmos géis foram alquilados com 100 μ L de iodoacetamida, 200 mM, por 30 min à temperatura ambiente, lavados com solução de bicarbonato de amônio, 100 mM, por 10min e desidratados com 200 μ L de acetonitrila por cinco minutos. A acetonitrila foi removida e realizada nova reidratação com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM, seguido de duas etapas de desidratação com 200 μ L de acetonitrila 100%.

Após a remoção da solução de acetonitrila, os géis foram secos à vácuo por 15 minutos. Foram adicionados 20 μL de uma solução de tripsina 25ng μL^{-1} por 45 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionada uma solução de 50 μL de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10%, overnight a 37°C.

3.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

Os géis foram fotodigitalizados em aparelho Image Scanner III (GE-Healthcare) e as imagens foram calibradas com o software Labscan (GE-Healthcare). As análises comparativas das imagens foram efetuadas utilizando o software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE-Healthcare).

O perfil proteômico do acesso diploide foi comparado ao perfil dos demais níveis de ploidia (aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide). Assim, o acesso diploide foi considerado como referência para possíveis modificações traducionais que ocorreram ao longo do tempo e para a formação dos outros níveis de ploidia. Nesse trabalho, cada nível de ploidia foi considerado um tratamento e para cada tratamento foram avaliadas três repetições.

Nas análises, foram realizadas avaliações tanto qualitativas quanto quantitativas. Nas análises qualitativas, foram consideradas divergências de expressão quando o *spot* foi visualizado nas três replicatas de uma determinada ploidia e não visualizado nas três replicatas da outra ploidia em análise. Já nas análises quantitativas, foram considerados diferencialmente expressos, *spots* que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas (Fold) acima de 1,5 e ANOVA com $p < 0.05$. Nessa avaliação, também foram considerados apenas os *spots* que se apresentavam reproduzíveis nas três replicatas de cada uma das ploidias analisadas. Para cada um dos *spots* diferencialmente expressos, foi calculado o valor médio da porcentagem de volume (%Vol) para o diploide (controle) e o outro nível de ploidia analisado (tratamento). Essa comparação indica a diferença de expressão destas proteínas entre os níveis de ploidia.

Para a detecção dos *spots* faz-se necessário escolher três parâmetros, a saber: *smooth*, saliência e mini área. O *smooth* é o número fixo de vezes que o

ImageMaster torna a imagem plana antes de detectar os *spots*. Saliência é a medida de curvatura dos *spots* (altura do *spot* em pixels do topo do *spot* ao background do gel - base). Mini área é definida como a área da base para eliminar todos os ruídos. Para esse experimento, de acordo com o perfil dos *spots* observados em *L. alba*, utilizamos *smooth*=2, *saliência*=40 e *mini área*=9.

3.8 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os peptídeos trípticos referentes aos *spots* que possuíam diferenças de expressão, qualitativa ou quantitativa, em comparação ao diploide, foram ressuspensos em 10µL de solução de acetonitrila 50% e acidificados com ácido trifluoracético 0,1%. Utilizou-se como matriz o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), que foi solubilizada na mesma solução da qual os peptídeos trípticos foram eluídos. Para a calibração do método de análise MS foram utilizados peptídeos padrões *peptide calibration standard II* (Bruker Daltonics, Alemanha). A seguir, 1µL de amostra e 1µL de matriz foram homogeneizados e aplicados em cada *spot* de placa de aço apropriada. Os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos em espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics) e por um espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo Autoflex speed (Bruker Daltonics).

Para a obtenção dos dados de MS utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 Da. Para a realização de MS/MS, foi usado o método LIFT no modo positivo, para o qual foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z).

Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo software Flexcontrol, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS e MS/MS processados com o auxílio do aplicativo flexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas no formato mascot generic format (mgf) pelo aplicativo BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

3.9 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As listas de massas foram confrontadas contra os Bancos de Dados de proteínas das espécies da ordem Lamiales e do grupo Viridiplantae, ambos depositadas no UNIPROT. A comparação foi realizada usando o aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; tolerância de erro para o íon parental de 0,2Da e para os fragmentos de 0,5Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

O resultado obtido pelo MASCOT foi validado pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INC., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados, os mesmos foram submetidos ao algoritmo Peptide Prophet (KELLER ET AL., 2002) e as proteínas ao algoritmo Protein Prophet (NESVIZHSKII et al., 2003). Utilizou-se como critério de aceitação os parâmetros com o mínimo de 90% de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos dois peptídeos para cada proteína identificada.

4 RESULTADOS

4.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A concentração de proteína total, obtida para cada amostra referente a um nível de ploidia pode ser visualizada na Tabela 2. Seus valores foram calculados a partir da equação da reta ($y = 0,5315x + 0,0284$), determinada de acordo com o método de Bradford, e respeitando o fator de diluição 1:30.

Tabela 2 – Valores de absorvância (nm) e concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) das amostras proteicas referentes a cinco acessos de *Lippia alba*: (BGEN-22 diploide), (BGEN-16 aneuploide), (BGEN-23 triploide), (BGEN-31 tetraploide) e (BGEN-42 hexaploide)..

| Amostra | | Absorvância (nm) | Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) |
|-----------------------|----|-----------------------------|--|
| (BGEN-22 diploide) | 1 | 0,4252 | 22,39699 |
| | 2 | 0,4989 | 26,55691 |
| | 3 | 0,4148 | 21,80997 |
| (BGEN-16 aneuploide) | 4 | 0,2318 | 11,48071 |
| | 5 | 0,2708 | 13,68203 |
| | 6 | 0,3849 | 20,1223 |
| (BGEN-23 triploide) | 7 | 0,3011 | 15,39229 |
| | 8 | 0,3232 | 16,6397 |
| | 9 | 0,2308 | 11,42427 |
| (BGEN-31 tetraploide) | 10 | 0,517 | 27,57855 |
| | 11 | 0,4109 | 21,58984 |
| | 12 | 0,3799 | 19,84008 |
| (BGEN-42 hexaploide) | 13 | 0,2643 | 13,31515 |
| | 14 | 0,3199 | 16,45343 |
| | 15 | 0,4304 | 22,6905 |

4.2 SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-SDS-PAGE)

Os géis referentes à separação de proteínas totais pela técnica de 2D-SDS-PAGE foram obtidos em triplicada para cada nível de ploidia analisado (diploide, aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide) totalizando 15 géis. Todos os valores de correlação (R^2) entre as replicatas referentes a cada ploidia foram maiores do que 0,85. Na figura 2, pode ser visualizado um gel representante de cada acesso. As imagens referentes a cada um dos géis realizados podem ser visualizadas no APÊNDICE B.

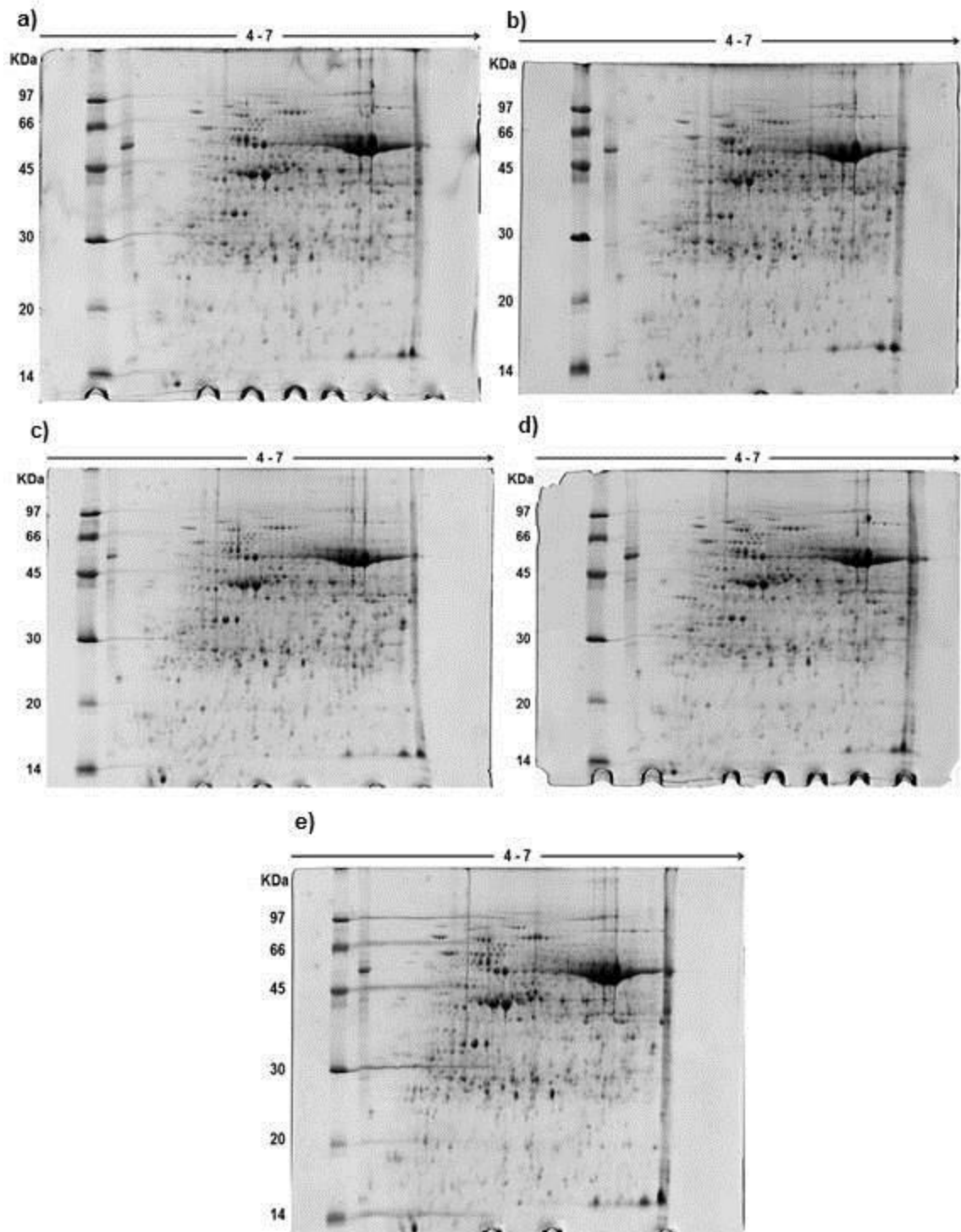


Figura 2 – Perfil de proteínas de folhas de *Lippia alba* em acessos (a) diploide, (b) aneuploide, (c) triploide, (d) tetraploide e (e) hexaploide. Foi utilizado 1000µg de proteínas para a eletroforese bidimensional. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7 para posterior separação por SDS-PAGE, e assim coradas com azul de coomassie.

4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

Ao comparar o perfil proteômico do acesso diploide ao perfil dos demais níveis de ploidia (aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide), foi possível identificar diferenças de expressão entre os *spots* analisados (diferenças estatísticas quantitativas nas comparações entre porcentagem de volume dos *spots*), assim como variações de ausência e presença na expressão de *spots* (diferenças qualitativas de expressão).

Seguindo a metodologia definida no item 3.7, foram encontrados 126 *spots* diferencialmente expressos entre aneuploide e diploide. Eles representam *spots* presentes tanto no acesso aneuploide quanto no diploide. Além disso, 89 *spots* foram expressos no acesso aneuploide e ausentes no diploide e 12 *spots* se mostraram presentes somente no acesso diploide. Já na análise entre os acessos triploide e diploide foram detectados 128 *spots* diferencialmente expressos entre os dois níveis de ploidia, sendo 46 presentes somente no triploide e 26 somente no diploide. Na comparação entre o perfil proteômico dos acessos tetraploide e diploide, por sua vez, foram observados 120 *spots* diferencialmente expressos sendo 48 presentes somente no tetraploide e 13 somente no diploide. Por fim, na análise entre os acessos hexaploide e diploide, 109 *spots* foram diferencialmente expressos, sendo 13 deles detectados somente no hexaploide e oito somente no diploide (Tabela 3).

Tabela 3 – Expressão qualitativa e quantitativa comparativa entre *spots* do acesso diploide e os demais níveis de ploidia (aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide), considerando razão entre porcentagem de volume maior que 1,5 (ANOVA com $p < 0,05$).

| Nível de Ploidia | Análise Qualitativa | | Análise Quantitativa |
|------------------|---|---|---|
| | <i>Spots</i> expressos apenas no diploide | <i>Spots</i> expressos apenas nas demais ploidias | <i>Spots</i> diferencialmente expressos |
| Aneuploide | 12 | 89 | 126 |
| Triploide | 26 | 46 | 128 |
| Tetraploide | 13 | 48 | 120 |
| Hexaploide | 08 | 13 | 109 |

No APÊNDICE C, são encontrados os valores relativos à porcentagem de volume, razão entre as porcentagens de volume e os valores de probabilidade da ANOVA, para todos os *spots* considerados diferencialmente expressos quando comparados aos *spots* do diploide.

4.4 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

A partir da análise dos espectros de massa, foram identificadas 44 proteínas. Essas proteínas foram divididas em classes de acordo com suas funções (AN et al., 2014): fotossíntese, n=27; energia e metabolismo, n=7; metabolismo de aminoácido, n=5; chaperonas, n=3; e estrutural n=2 (Figura 3).

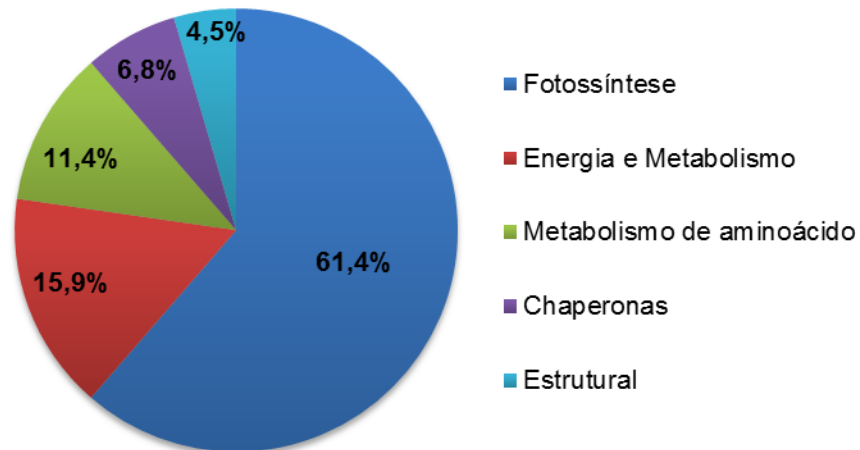


Figura 3 – Distribuição percentual das 44 proteínas identificadas em folha de *Lippia alba* de acordo com suas funções.

Na Tabela 4, podem ser visualizadas as proteínas que foram identificadas e os dados referentes a identificação de cada uma delas.

As proteínas identificadas como 69 e 102 representam *spots* equivalentes (massa molecular e ponto isoelétrico) retirados de géis diferentes. Dessa forma, por terem obtido a mesma identificação (cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase) corrobora-se a qualidade da análise. O mesmo pode ser observado entre os *spots* 114 e 396 (cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase); 274 e 356 (cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase); e 359 e 386 (tubulina cadeia alfa).

Tabela 4 - Proteínas Identificadas em *Lippia alba*, por meio da aquisição de espectros utilizando MALDI TOF/TOF.

| ID ⁽¹⁾ | Proteínas analisadas | Data Base | Número de Acesso | Score ⁽²⁾ | MW/PI teórica ⁽³⁾ | Cobertura | NPVI ⁽⁵⁾ |
|---------------------|--|-----------------------|------------------|----------------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| Fotossíntese | | | | | | | |
| 39 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 181 | 52176/6,14 | 5% | 2 |
| 40 | Cadeia curta da ribulose bifosfato carboxilase | Viridiplantae/UNIPROT | B9T1N0 | 330 | 21068/9,03 | 11% | 2 |
| 69 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 117 | 52176/6,14 | 5% | 2 |
| 100 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 136 | 52176/6,14 | 5% | 2 |
| 101 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 491 | 52176/6,14 | 15% | 6 |
| 102 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 242 | 52176/6,14 | 7% | 3 |
| 114 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 119 | 52176/6,14 | 5% | 2 |
| 145 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 188 | 52176/6,14 | 5% | 2 |
| 158 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 185 | 52176/6,14 | 5% | 2 |
| 179 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 188 | 52176/6,14 | 7% | 3 |
| 186 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 206 | 52176/6,14 | 9% | 3 |
| 274 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 256 | 52176/6,14 | 7% | 3 |
| 293 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 360 | 52176/6,14 | 14% | 6 |
| 356 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 430 | 52176/6,14 | 10% | 4 |
| 396 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 334 | 52176/6,14 | 8% | 3 |
| 397 | Subunidade de proteína de ligação à subunidade grande de RuBisCO beta, cloroplastica [Erythranthe guttata] | Lamiales/UNIPROT | A0A022QVT7 | 151 | 6458/5,91 | 7% | 3 |
| 486 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 142 | 52176/6,14 | 5% | 2 |
| 494 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 121 | 52176/6,14 | 5% | 2 |

Tabela 4 (continuação) – Proteínas identificadas em *Lippia alba*, por meio da aquisição de espectros utilizando MALDI TOF/TOF.

| ID ⁽¹⁾ | Proteínas analisadas | Data Base | Número de Acesso | Score ⁽²⁾ | MW/PI teórico ⁽³⁾ | Cobertura | NPVI ⁽⁴⁾ |
|------------------------------|--|-----------------------|------------------|----------------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| Fotossíntese | | | | | | | |
| 497 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 147 | 52176/6,14 | 5% | 2 |
| 502 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 223 | 52176/6,14 | 7% | 3 |
| 552 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Lamiales/UNIPROT | A2VAW0 | 178 | 52176/6,14 | 5% | 2 |
| 6 | Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase, cloroplástica [<i>Erythranthe guttata</i>] | Lamiales/UNIPROT | A0A022RMR9 | 222 | 42977/6,38 | 6% | 2 |
| 90 | Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica (fragmento) | Viridiplantae/UNIPROT | I7DFU7 | 114 | 16135/7,82 | 21% | 2 |
| 126 | Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica | Lamiales/UNIPROT | S8CXZ6 | 115 | 52263/6,12 | 4% | 2 |
| 154 | Anidrase carbônica | Lamiales/UNIPROT | A0A022RXG1 | 193 | 36206/6,19 | 11% | 2 |
| 229 | Frutose-bifosfato aldolase | Lamiales/UNIPROT | A0A022QQY6 | 470 | 35453/5,47 | 15% | 4 |
| 325 | Frutose-1,6-bisfosfatase, cloroplástica, chloroplastic-like [<i>Ipomoea nil</i>] | Viridiplantae/UNIPROT | A0A068UD94 | 105 | 38816/4,78 | 6% | 2 |
| Energia e Metabolismo | | | | | | | |
| 211 | Fosfoglicerato quinase | Viridiplantae/UNIPROT | A0A0B0MPQ5 | 606 | 51025/8,55 | 19% | 6 |
| 212 | Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase | Lamiales/UNIPROT | G3FGU9 | 324 | 42885/6,54 | 13% | 4 |
| 289 | ATP sintase subunidade alfa | Lamiales/UNIPROT | A0A0U1YHF0 | 301 | 55352/5,14 | 15% | 5 |
| 372 | Subunidade ATPase de protótipo de V tipo B2 [<i>Erythranthe guttata</i>] | Lamiales/UNIPROT | A0A022RE19 | 190 | 71829/5,35 | 4% | 2 |
| 378 | ATP sintase subunidade alfa | Lamiales/UNIPROT | A0A0S1EHH6 | 338 | 55362/5,19 | 12% | 5 |
| 523 | ATP sintase subunidade alfa | Lamiales/UNIPROT | A0A0S1EHH6 | 337 | 55362/5,19 | 4% | 4 |
| 599 | Enolase | Viridiplantae/UNIPROT | A0A0V0IB00 | 216 | 48055/5,58 | 8% | 2 |

Tabela 4 (continuação) - Proteínas identificadas em *Lippia alba*, por meio da aquisição de espectros utilizando MALDI TOF/TOF.

| ID ⁽¹⁾ | Proteínas analisadas | Data Base | Número de Acesso | Score ⁽²⁾ | MW/PI teórico ⁽³⁾ | Cobertura | NPVI ⁽⁴⁾ |
|----------------------------------|--|-----------------------|------------------|----------------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| Metabolismo de Aminoácido | | | | | | | |
| 270 | Glutamina sintetase | Viridiplantae/UNIPROT | A0A078BYL3 | 256 | 39104/5,4 | 8% | 2 |
| 322 | S-adenosilmetionina sintetase | Lamiales/UNIPROT | A0A022PV61 | 154 | 43663/5,5 | 6% | 2 |
| 452 | 5-metiltetrahydropteriltriglutamato-homocisteína metiltransferase [<i>Erythranthe guttata</i>] | Lamiales/UNIPROT | A0A022RIJ6 | 94 | 84718/5,86 | 4% | 2 |
| 543 | Cisteína sintase, cloroplástica [<i>Erythranthe guttata</i>] | Lamiales/UNIPROT | A0A022RLV8 | 291 | 30315/5,39 | 12% | 2 |
| 753 | 5-metiltetrahydropteriltriglutamato-homocisteína metiltransferase [<i>Erythranthe guttata</i>] | Lamiales/UNIPROT | A0A022RIJ6 | 187 | 84718/5,86 | 4% | 2 |
| Chaperonas | | | | | | | |
| 340 | Proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico [<i>Erythranthe guttata</i>] | Lamiales/UNIPROT | A0A022RS05 | 471 | 41375/8,2 | 22% | 6 |
| 364 | Proteína cognata de choque térmico 80 [<i>Ziziphus jujuba</i>] | Lamiales/UNIPROT | S8DFN4 | 139 | 80387/5,02 | 4% | 2 |
| 471 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase) | Viridiplantae/UNIPROT | W9QW97 | 201 | 28071/9,56 | 13% | 2 |
| Estrutural | | | | | | | |
| 359 | Tubulina cadeia alfa | Lamiales/UNIPROT | A0A022R715 | 150 | 50203/4,87 | 6% | 2 |
| 386 | Tubulina cadeia alfa | Lamiales/UNIPROT | A0A022R715 | 170 | 50203/4,87 | 6% | 2 |

(1) Identificação da amostra

(2) Score obtido no Mascot

(3) Massa Molecular Teórica e Ponto Isoelétrico Teórico

(4) Número de peptídeos identificados e validados pelo Scaffold

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Após a identificação das 44 proteínas, analisou-se a expressão dos seus *spots* correspondentes nos géis do acesso diploide em comparação com os *spots* correspondentes nas demais ploidias (aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide). As proteínas identificadas que representavam *spots* equivalentes (102, 396, 356 e 386) em outros géis foram retiradas dessa análise para que não houvesse duplicação dos mesmos resultados da análise de expressão. Foi analisada, portanto, a expressão de 40 proteínas. Dessas, 31 proteínas foram analisadas de acordo com as diferenças quantitativas de porcentagem de volume dos seus *spots* em todas as ploidias (Tabela 5), enquanto 9 foram analisadas qualitativamente de acordo com a presença ou ausência do *spot* nas ploidias analisadas (Tabela 6). Os dados detalhados utilizados para essa análise estatística encontram-se no APÊNDICE D.

Tabela 5 – Proteínas diferencialmente expressas de *Lippia alba* em comparação ao acesso diploide, considerando ANOVA $p < 0,05$ e FOLD (razão entre as porcentagens de volume) $> 1,5$.

| ID ⁽¹⁾ | Proteínas analisadas | Ploidia com maior expressão | | | |
|---------------------|---|-----------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| | | Diploide x Aneuploide | Diploide x Triploide | Diploide x Tetraploide | Diploide x Hexaploide |
| Fotossíntese | | | | | |
| 39 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | = ⁽²⁾ | Triploide | = | = |
| 40 | Cadeia curta da ribulose bifosfato carboxilase | Aneuploide | Triploide | = | Hexaploide |
| 69 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | Triploide | = | = |
| 100 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | = | Triploide | = | = |
| 101 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | = | Triploide | = | = |
| 114 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Diploide | = | = | Diploide |
| 145 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | = | Triploide | = | = |
| 158 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | Aneuploide | Triploide | = | = |
| 179 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | = | Triploide | = | = |
| 186 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | = | Triploide | = | = |
| 274 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | = | = | Diploide | Diploide |
| 293 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | = | = | Diploide | Diploide |
| 397 | Subunidade de proteína de ligação à subunidade grande de RuBisCO beta, cloroplástica [<i>Erythranthe guttata</i>] | = | Diploide | = | = |
| 497 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Diploide | Triploide | = | Diploide |

Tabela 5 (continuação) – Proteínas diferencialmente expressas de *Lippia alba* em comparação ao acesso diploide considerando ANOVA $p < 0,05$ e FOLD (razão entre as porcentagens de volume) $> 1,5$.

| ID ⁽¹⁾ | Proteínas analisadas | Ploidia com maior expressão | | | |
|----------------------------------|--|-----------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| | | Diploide x Aneuploide | Diploide x Triploide | Diploide x Tetraploide | Diploide x Hexaploide |
| Fotossíntese | | | | | |
| 6 | Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, cloroplástica [<i>Erythranthe guttata</i>] | = | = | Diploide | Diploide |
| 90 | Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica (fragmento) | = | = | Diploide | Diploide |
| 126 | Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica | Aneuploide | Triploide | = | Hexaploide |
| 154 | Anidrase carbônica | = | Triploide | Tetraploide | = |
| 229 | Frutose-bifosfato aldolase | = | Triploide | = | = |
| 325 | Frutose-1,6-bifosfatase, cloroplástica [<i>Ipomoea nil</i>] | = | Triploide | Diploide | = |
| Energia e Metabolismo | | | | | |
| 211 | Fosfoglicerato quinase | Diploide | = | = | Diploide |
| 212 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | = | Triploide | = | Diploide |
| 289 | ATP sintase subunidade alfa | = | = | = | Diploide |
| 372 | Subunidade ATPase de protótipo de V tipo B2 [<i>Erythranthe guttata</i>] | = | Diploide | = | = |
| 378 | ATP sintase subunidade alfa | Diploide | Diploide | = | Diploide |
| Metabolismo de Aminoácido | | | | | |
| 270 | Glutamina sintetase | = | Triploide | = | = |
| 322 | S-adenosilmetionina sintetase | = | Triploide | Tetraploide | Hexaploide |

Tabela 5 (continuação) – Proteínas diferencialmente expressas de *Lippia alba* em comparação ao acesso diploide considerando ANOVA $p < 0,05$ e FOLD (razão entre as porcentagens de volume) $> 1,5$

| ID ⁽¹⁾ | Proteínas analisadas | Ploidia com maior expressão | | | |
|----------------------------------|--|-----------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| | | Diploide x Aneuploide | Diploide x Triploide | Diploide x Tetraploide | Diploide x Hexaploide |
| Metabolismo de Aminoácido | | | | | |
| 452 | 5-metiltetrahydropteroylglutamato-homocisteína metiltransferase [<i>Erythranthe guttata</i>] | = | Diploide | Diploide | = |
| Chaperonas | | | | | |
| 340 | Proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico [<i>Erythranthe guttata</i>] | = | = | = | Hexaploide |
| 364 | Proteína cognata de choque térmico 80 [<i>Ziziphus jujuba</i>] | = | = | = | Diploide |
| Estrutural | | | | | |
| 359 | Tubulina cadeia alfa | = | = | = | Diploide |

(1) Identificação da amostra

(2) Proteínas igualmente expressas nas plodias analisadas, considerando ANOVA $p < 0,05$ e FOLD (razão entre as porcentagens de volume) $> 1,5$.

Tabela 6 – Expressão qualitativa de proteínas identificadas em folhas de *Lippia alba* em cinco níveis de ploidia (diploide, aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide).

| ID ⁽¹⁾ | Proteínas analisadas | Análise de Expressão | | | | |
|----------------------------------|--|----------------------|------------|-----------|-------------|------------|
| | | Diploide | Aneuploide | Triploide | Tetraploide | Hexaploide |
| Fotossíntese | | | | | | |
| 486 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | - | - | X | - | - |
| 494 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | - | - | X | - | - |
| 502 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | - | - | X | X | X |
| 552 | Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | - | X | X | - | X |
| Energia e Metabolismo | | | | | | |
| 523 | ATP sintase subunidade alfa | - | - | X | - | - |
| 543 | Cisteína sintase, cloroplástica [<i>Erythranthe guttata</i>] | - | - | - | - | X |
| 599 | Enolase | - | - | X | X | X |
| Metabolismo de Aminoácido | | | | | | |
| 753 | 5-metiltetrahydropteroltriglutamato-homocisteína metiltransferase [<i>Erythranthe guttata</i>] | X | X | - | - | - |
| Chaperona | | | | | | |
| 471 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase) | - | X | X | - | X |

(-) Spot Ausente

(X) Spot Presente

A distribuição percentual das proteínas identificadas, de acordo com as classes definidas, em cada uma das ploidias pode ser observada nas figuras 4, 5, 6, 7 e 8.

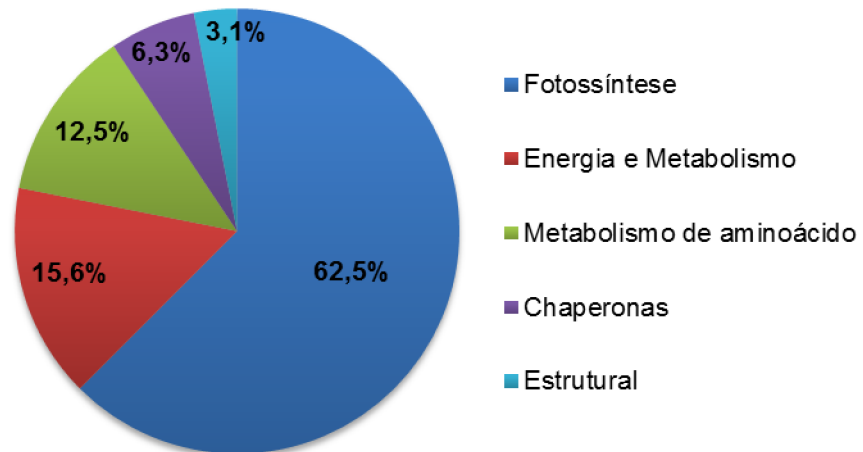


Figura 4 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de *Lippia alba* do acesso diploide.

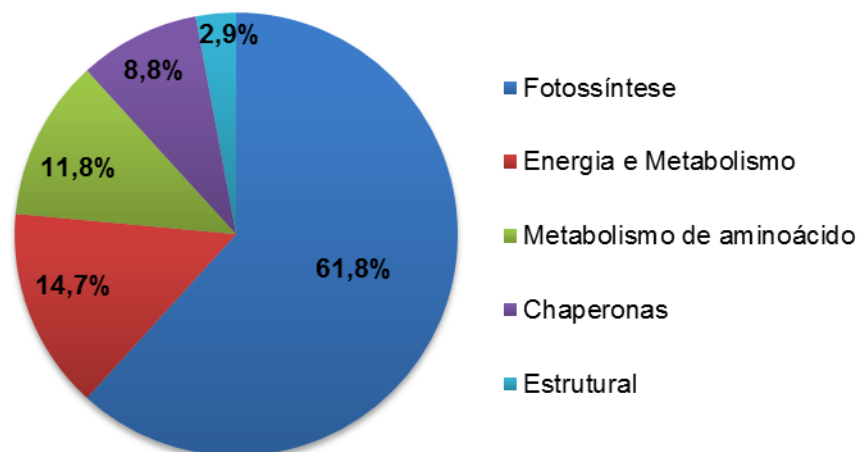


Figura 5 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de *Lippia alba* do acesso aneuploide.

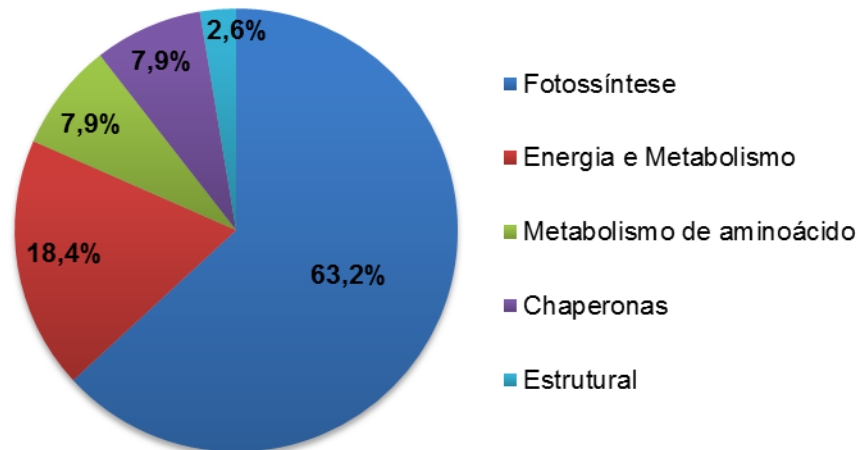


Figura 6 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de *Lippia alba* do acesso triploide.

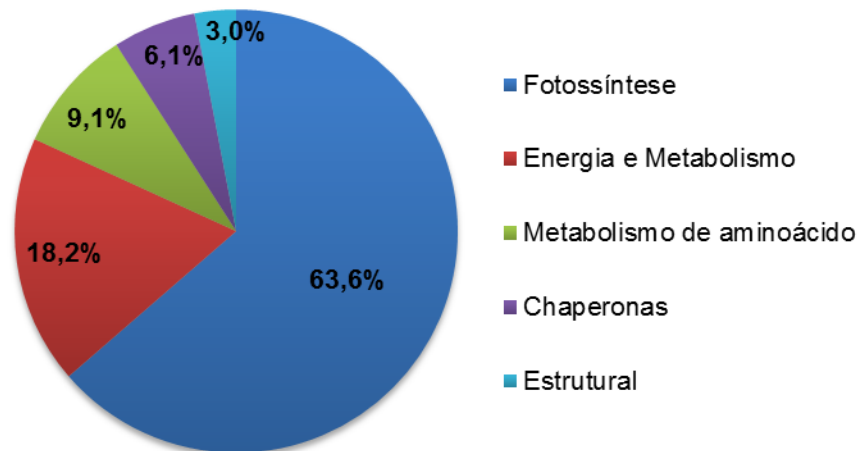


Figura 7 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de *Lippia alba* do acesso tetraploide.

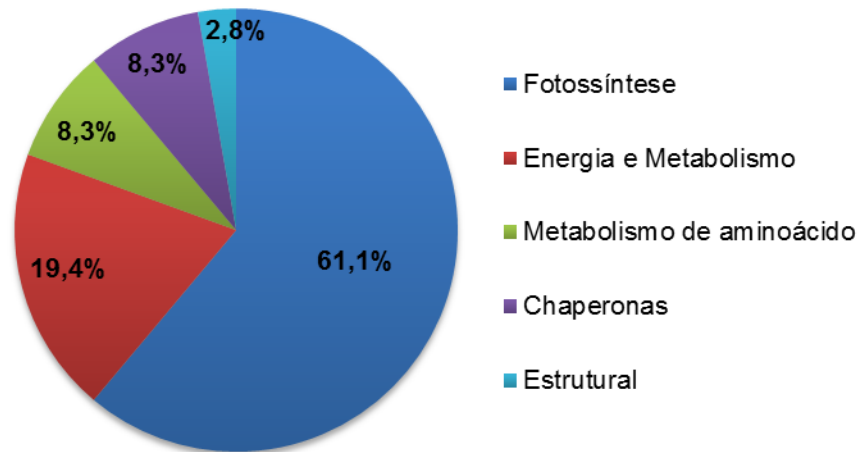


Figura 8 – Distribuição percentual das proteínas identificadas em folha de *Lippia alba* do acesso hexaploide.

Análise de expressão quantitativa, por sua vez, também pode ser vista nas figuras 9, 10, 11 e 12 de acordo com as separações realizadas previamente das proteínas identificadas em classes.

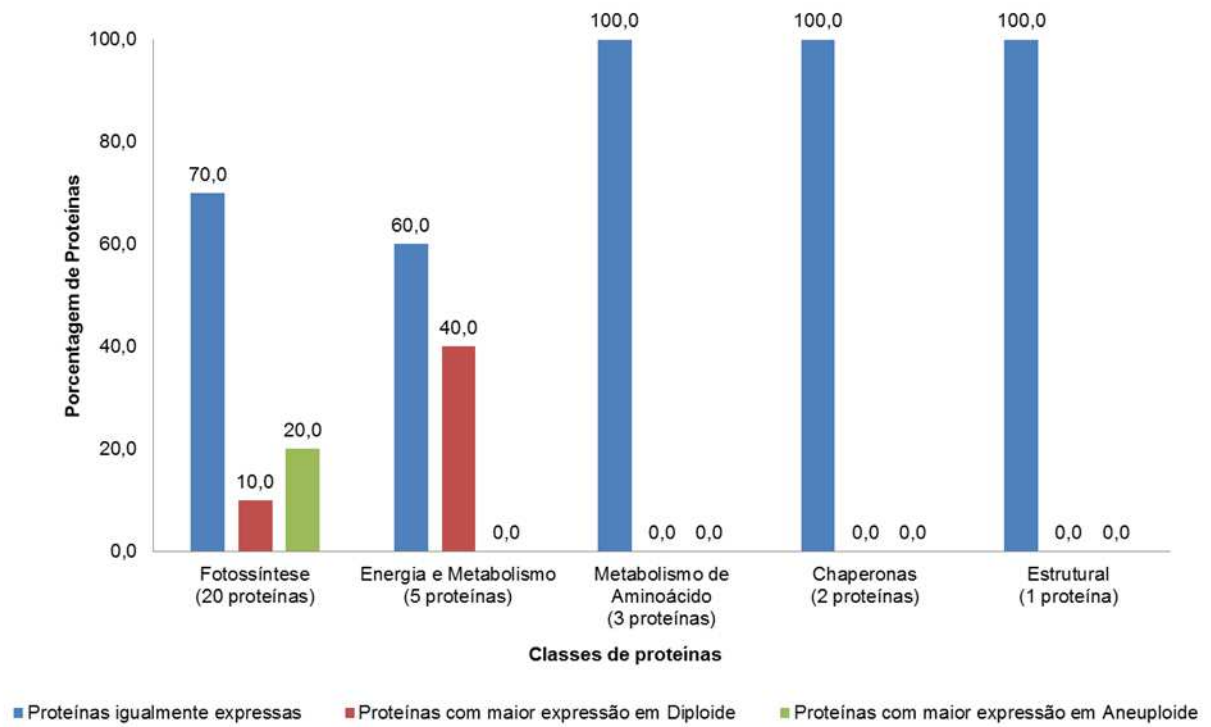


Figura 9 – Expressão comparativa de cinco classes de proteínas entre acesso diploide e aneuploide de *Lippia alba*.

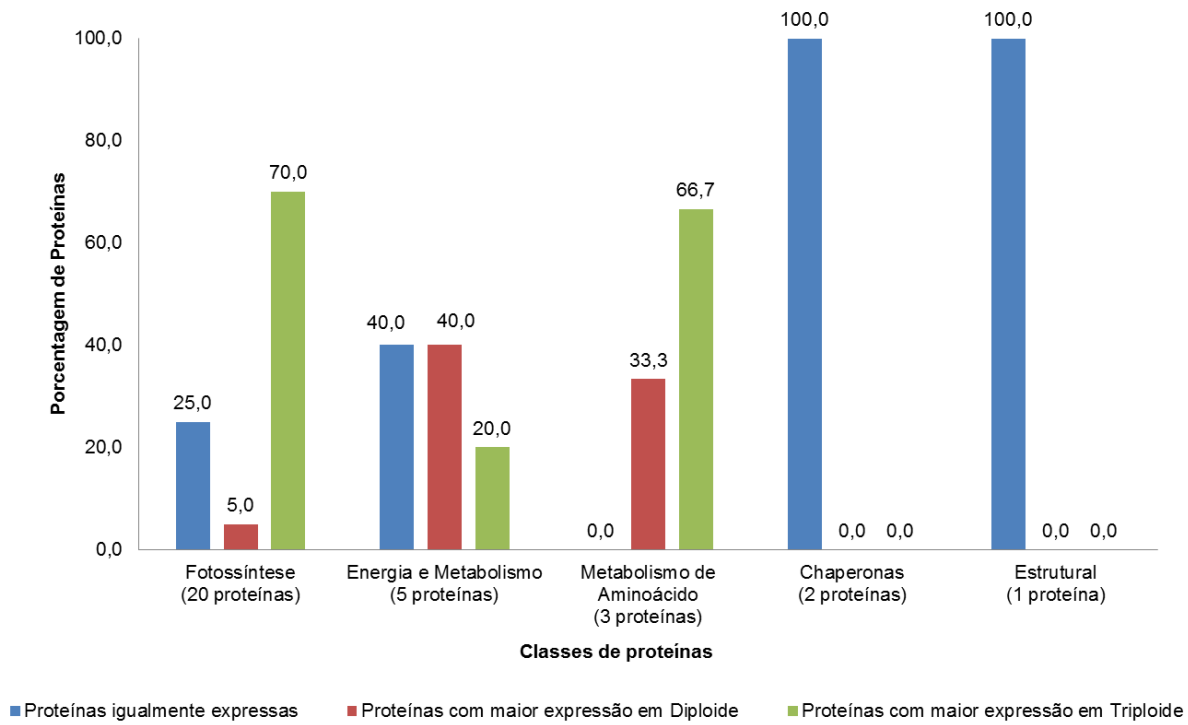


Figura 10 - Expressão comparativa de cinco classes de proteínas entre acesso diploide e triploide de *Lippia alba*.

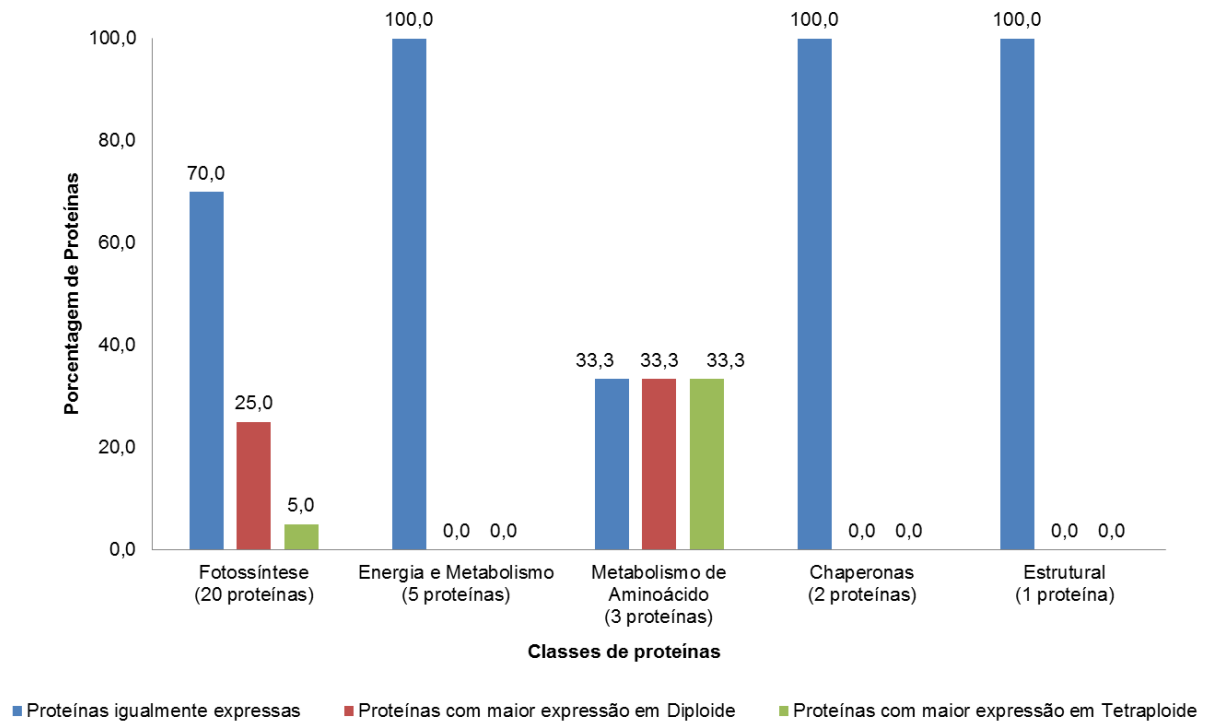


Figura 11 - Expressão comparativa de cinco classes de proteínas entre acesso diploide e tetraploide de *Lippia alba*.

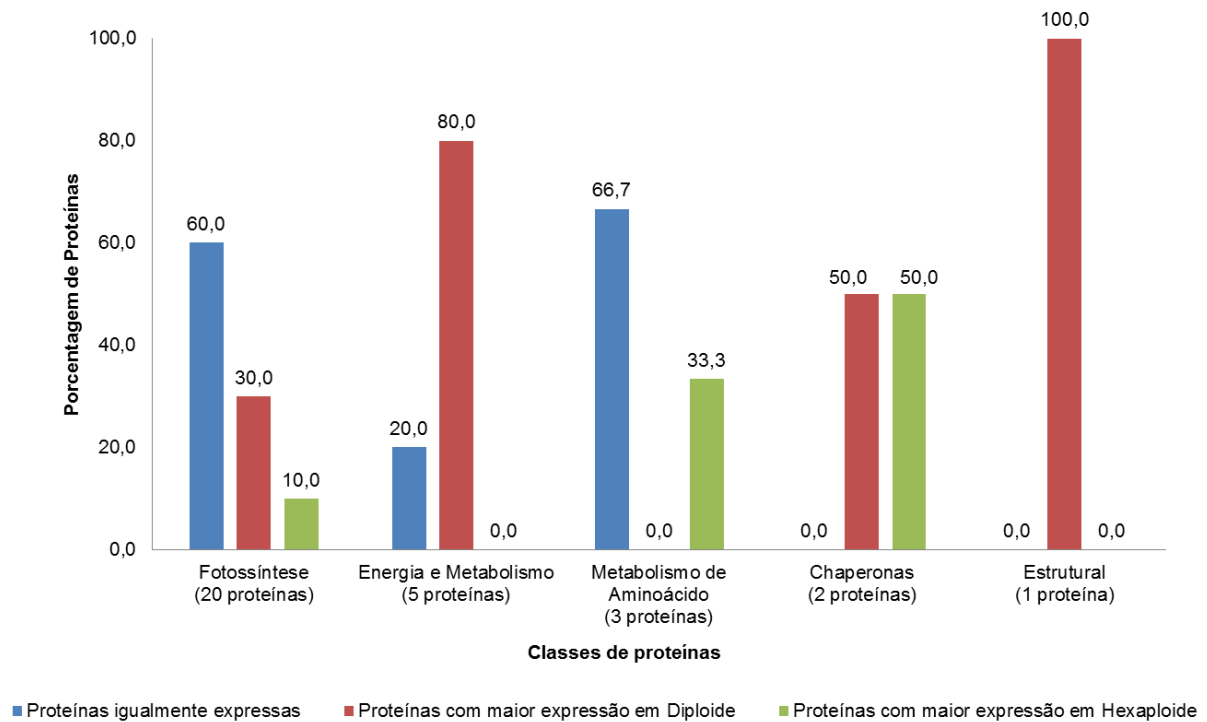


Figura 12 – Expressão comparativa de cinco classes de proteínas entre acesso diploide e hexaploide de *Lippia alba*.

A análise de expressão qualitativa de acordo com a classe das proteínas identificadas referentes aos *spots* presentes pode ser visualizada na figura 13.

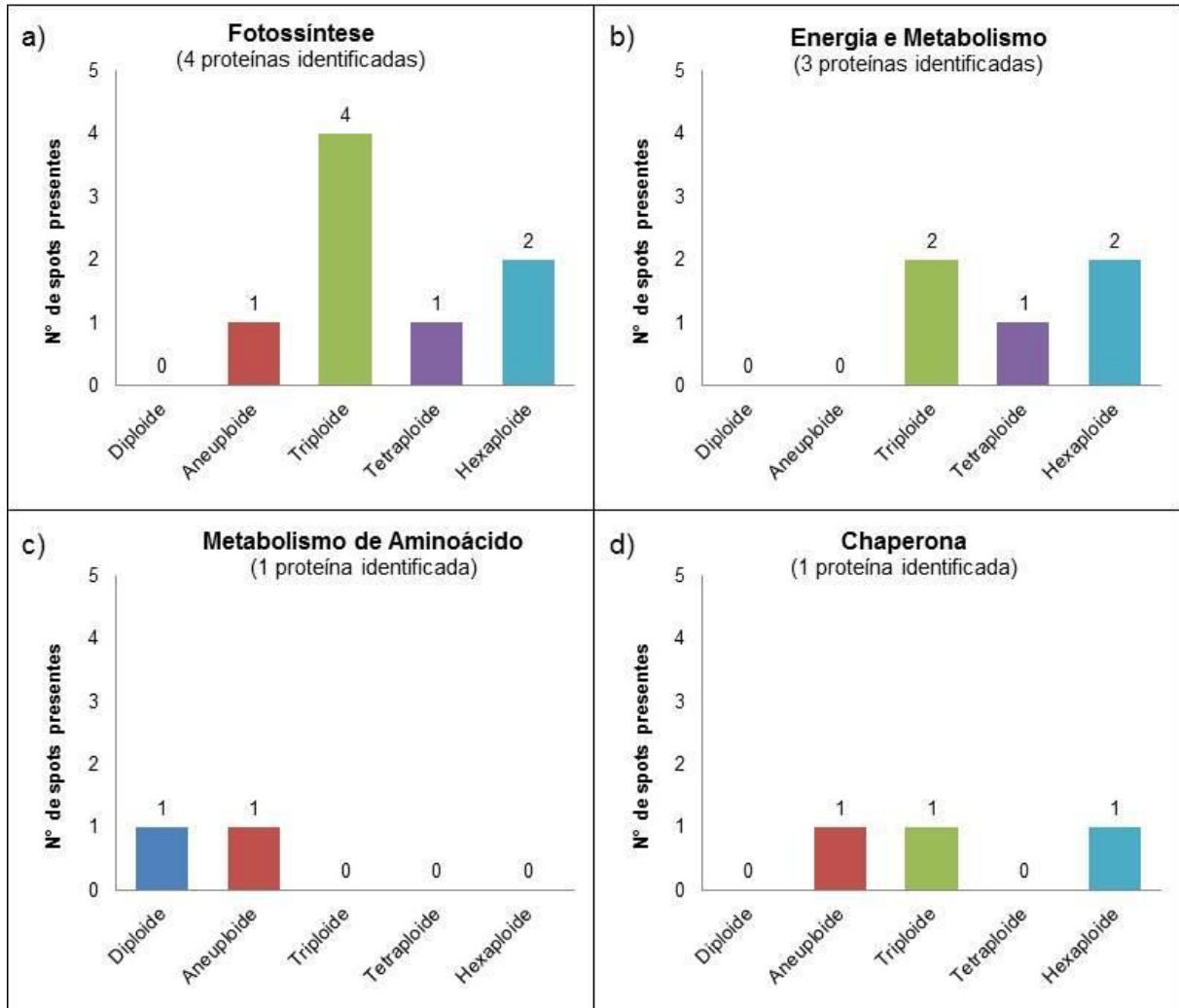


Figura 13 – Análise comparativa de expressão qualitativa das proteínas identificadas de folhas de *Lippia alba* em acessos diploide, aneuploide, triploide, tetraploide, hexaploide. a, b, c e d mostram o número de *spots* presentes em cada ploidia de acordo com a classificação dada às suas proteínas identificadas.

Na figura 14, podem ser observadas as variações de volume, entre os acessos analisados, referente ao *spot* de ID 340 que tem como proteína identificada a proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico. Nessa análise, foi observada diferença de expressão significativa apenas no acesso hexaploide.

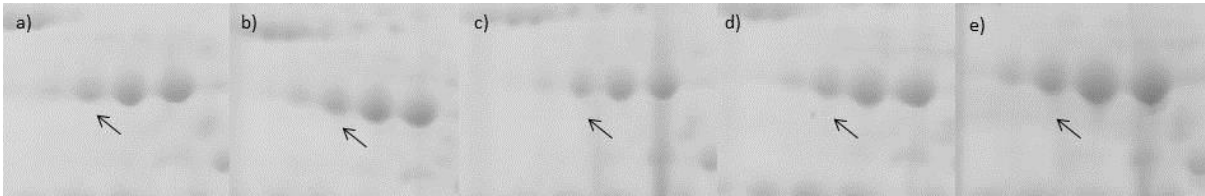


Figura 14 – Expressão quantitativa diferencial da proteína 2 de 70 kDa (setas) relacionada ao choque térmico respectivamente nos acessos diploide (a), aneuploide (b), triploide (c), tetraploide (d) e hexaploide (e) de *Lippia alba*. Observa-se maior expressão no acesso hexaploide em relação ao diploide.

Na figura 15, podem ser observadas as variações qualitativas de expressão, entre os acessos nos quais há variações de presença e ausência do *spot* de ID 471, identificado como a proteína peptidil-prolil cis-trans isomerase. O *spot* mostra-se presente nos acessos aneuploide, triploide e hexaploide e ausente em diploide e tetraploide.



Figura 15 – Expressão qualitativa diferencial da proteína peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) respectivamente nos acessos diploide (a), aneuploide (b), triploide (c), tetraploide (d) e hexaploide (e) de *Lippia alba*. Observou-se a presença do *spot* nos acessos aneuploide, triploide e hexaploide e ausência dos mesmos nos géis diploide e tetraploide.

5 DISCUSSÃO

Estudos proteômicos em plantas poliploides ainda foram pouco explorados. Dados obtidos até o momento indicam maiores semelhanças entre proteomas de plantas autoploides do que aloploides. Essas semelhanças são mais presentes em comparações entre indivíduos diploides e tetraploides. Porém, divergências também foram encontradas nesses indivíduos. Essas divergências existem em determinadas espécies autoploides e, também, dentro de uma mesma espécie no estudo de proteínas específicas, como as relacionadas a mecanismos de defesa (SOLTIS et al., 2016).

Nesse trabalho foi realizada uma primeira análise proteômica de folhas de *Lippia alba* com a finalidade de melhor compreender a variação genômica existente nessa espécie e sua relação com a expressão dos genes. A análise de expressão dos spots referentes às proteínas extraídas das folhas de *Lippia alba* apresentaram variações tanto qualitativa quanto quantitativa entre ploidias superiores (aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide) em comparação ao diploide. Esses dados mostraram possíveis diferenças nas proteínas expressas e suas quantidades, indicando uma variação no conteúdo proteico desses acessos.

As proteínas identificadas nesse trabalho estão relacionadas essencialmente com o metabolismo primário de *Lippia alba*. O metabolismo primário das plantas é responsável pela síntese de compostos essenciais para a sua sobrevivência, sendo produzidos de forma ubíqua pelas diversas espécies vegetais (AHARONI e GALILI, 2011). Substâncias como “celulose, lignina, proteínas, lipídeos e açúcares se enquadram nesta classe (Pereira e Cardoso, 2012)”.

De forma prevalente, foi identificada a proteína ribulose bifosfato carboxilase (rubisco), com 21 identificações. Essa proteína é responsável pela conversão do carbono inorgânico, na forma de CO₂, em carbônico orgânico, no ciclo Calvin-Benson-Bassham. A Rubisco é a proteína mais abundante na natureza e pode constituir cerca de 50% do conteúdo proteico das folhas o que justifica sua identificação prevalente nesse trabalho. Sua forma mais abundante é um complexo hexadecimais constituído por oito subunidades grandes e oito pequenas (BRACHER et al., 2016).

Apesar de a rubisco representar grande parte das proteínas identificadas nesse trabalho, outras proteínas importantes do metabolismo primário relacionadas à fotossíntese, ao metabolismo de carboidratos, ao metabolismo de aminoácidos, e a funções estruturais, também foram identificadas.

Ainda em relação à atividade fotossintética podemos ressaltar, por exemplo, o papel regulatório na assimilação de CO₂ da frutose-1,6-bifosfatase cloroplástica (CHUECA et al., 2002). A proteína identificada como ATP sintase, por sua vez, possui importante papel na liberação de energia a partir da hidrólise de ATP (FINBOW e HARRISON, 1997). A síntese de aminoácidos pôde ser vista em proteínas como a glutamina sintetase que é responsável pela formação de glutamina, além de ser a primeira enzima da via principal de assimilação de amônia (CASTRO-RODRÍGUES et al., 2015). As chaperonas, como a proteína cognata de choque térmico 80, utilizam a energia da hidrólise de ATP para desnovelar proteínas, possibilitando novo enovelamento, impedindo a agregação de proteínas, garantindo seu dobramento de forma correta e mantendo as proteínas em estado solúvel (HARTL et al., 2011). Por fim, também foram identificadas alfa-tubulinas que juntamente com as beta-tubulinas são responsáveis pela formação dos microtúbulos, possuindo, portanto, importante função na estrutura e divisão celular (HAMMOND et al., 2008).

Embora as proteínas identificadas estejam relacionadas diretamente ao metabolismo primário de *Lippia alba*, o metabolismo secundário em plantas é intimamente interligado ao metabolismo primário, uma vez que suas reações bioquímicas não são independentes. De forma geral, os metabólitos secundários são produzidos a partir de dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato, originários do metabolismo da glicólise (PEREIRA e CARDOSO, 2012). Dessa forma, alterações no metabolismo primário podem afetar o funcionamento do metabolismo secundário.

Os metabólitos secundários não são necessariamente essenciais ao organismo, porém eles possuem um papel importante na sobrevivência da planta ao mediar interações da mesma com seu ambiente (SANTOS, 2000). Os metabólitos secundários estão envolvidos: na resistência contra pragas e doenças; resistência à radiação UV; na atração de polinizadores; na interação com microrganismos simbióticos; na alelopatia; sinalização, entre outras funções (AHARONI e GALILI,

2011). Esses metabólitos encontram-se presentes em concentrações bem menores do que os metabólitos primários (COLLIN, 2000).

Lippia alba é considerada uma planta medicinal, sendo seus metabólitos secundários importantes substâncias farmacológicas para diversos tipos de tratamento, além de possuírem outros interesses comerciais (BLANK et al., 2015). A fim de se obter um tratamento fitoterápico adequado é de suma importância conhecer as variações existentes dos compostos farmacologicamente ativos, uma vez que alterações nos mesmos levam a mudanças no efeito terapêutico esperado (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Além disso, por se tratar de um complexo poliploide, *Lippia alba* pode ser um importante alvo de estratégias de melhoramento, conforme já vem ocorrendo com outros poliploides (SATTLER et al., 2016). Nesse sentido, estudos de sua composição proteica frente as suas alterações cromossômicas acrescentam novas perspectivas nessa área. Neste trabalho foi possível obter uma ideia inicial das variações de expressão existentes das proteínas encontradas, de acordo com as ploidias analisadas.

A análise de expressão dos *spots* diferencialmente expressos das proteínas identificadas não mostrou um aumento da expressão proteica conforme o aumento do nível de ploidia. Isso pode ser consequência da atuação de diferentes mecanismos que possibilitam um balanceamento das cópias gênicas, conforme já relatado em poliploides (YOO et al., 2014).

Além disso, percebe-se que embora haja diferenças estatísticas de expressão, essas diferenças por vezes poderiam estar sendo compensadas por *spots* que representam diferentes isoformas existentes para uma mesma proteína. Isso pode ser exemplificado no caso da ribulose que ao ter um *spot* mais expresso numa determinada ploidia (exemplo: aneuploide, ID 69; Tabela 5), possui igualmente outro *spot* mais expresso no diploide, aqui usado como referência (exemplo: ID 114; Tabela 5). Outro exemplo é o caso da proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica, e possui maior expressão em diploide (ID 90) em comparação ao hexaploide. Por outro lado, no *spot* ID 126 a expressão é maior no hexaploide para a mesma proteína (Tabela 5).

Em um panorama geral dos dados obtidos nesse trabalho, as semelhanças encontradas mostram-se mais evidentes na comparação entre diploide e os acessos aneuploide e tetraploide (Tabela 5 e Figura 9 e 11). O acesso

hexaploide também se mostrou semelhante, porém apresentou por vezes menor expressão em relação ao diploide (veja, por exemplo, as proteínas de metabolismo, Tabela 5, Figura 12). Essa expressão diminuída de proteínas relacionadas ao metabolismo, talvez esteja relacionada ao porte da planta, uma vez que a planta hexaploide, possui um tamanho significativamente menor do que a planta diploide (dados não publicados), o que poderia explicar quantidades menores de proteínas relacionadas ao metabolismo primário. Por outro lado, em sua análise qualitativa (Tabela 6 e Figura 13) ele apresentou presença de *spots* relacionados ao metabolismo e à fotossíntese, enquanto os mesmos eram ausentes em diploides. Talvez as divergências de expressão total de proteínas do metabolismo primário de forma geral não sejam muito significativas.

O acesso triploide, nesse estudo, correspondeu à ploidia que apresentou maiores diferenças em comparação ao acesso diploide. Por possuir três genomas, sendo a única ploidia de número ímpar, o triploide mostra-se geneticamente mais instável que os demais, com tendência à esterilidade e ausência de produção de sementes (WANG et al., 2016). Dessa forma, as maiores variações proteicas encontradas nesse acesso podem ser reflexo de uma necessidade diferenciada de equilíbrio das instabilidades geradas, por não se tratar de um conjunto genômico balanceado.

Nas análises qualitativas realizadas nesse trabalho, os triploides, tiveram mais *spots* presentes enquanto esses mesmos *spots* mostravam-se ausentes no acesso diploide. Pode ser observado, por exemplo, a presença de quatro *spots* correspondentes à proteína Rubisco no acesso triploide enquanto essas apresentam-se ausentes no diploide (Tabela 6). Esses dados de expressão corroboram a maior expressão da proteína rubisco, em comparação ao diploide, já observada nas análises quantitativas de expressão (Tabela 5). Esses resultados juntamente com uma maior expressão de outras proteínas relacionadas à fotossíntese pelo acesso triploide (como a anidrase carbônica e a frutose-1,6-bifosfatase) indicam uma possível maior expressão de proteínas relacionadas à fotossíntese por indivíduos triploides.

Os acessos triploides de *Lippia alba* apresentam-se como plantas menos vigorosas em comparação às demais ploidias. Eles possuem folhas menores em relação aos acessos diploides e tetraploides e, também, representam a ploidia com o menor número de folhas por acesso (dados não publicados). Nesse contexto, o

aumento relatado nas proteínas de metabolismo primário, de forma mais expressiva nas proteínas relacionadas à fotossíntese, não aparenta estar diretamente relacionado com diferenças em atividades fotossintéticas e estruturais da planta. Primeiramente, isso poderia ser justificado por uma questão de amostragem, por hipótese ainda pequena das proteínas identificadas, ou dos parâmetros utilizados para tal finalidade que pode não estar correspondendo a reais divergências de metabolismo primário existente entre essas ploidias. Por outro lado, podemos supor um gasto energético diferente entre os indivíduos triploides em relação às demais ploidias analisadas. Esse gasto energético poderia estar relacionado mais intimamente com metabolismo secundário dessas plantas uma vez que as rotas biossintéticas de metabolismo primário e secundário são interligadas. Assim, maior produção de metabólitos primários no acesso triploide pode estar relacionada a uma diferença de produção de metabólitos secundários por essas plantas.

Em *Lippia alba*, já foram identificados por Viccini et al. (2014) diferenças de composição dos terpenos em seus óleos essenciais em acessos triploides em relação a acessos diploides e tetraploides. Essa divergência reforça uma possível diferença na expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo secundário de organismos triploides.

A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que apresentou maior expressão no acesso triploide (Tabela 5), por exemplo, foi identificada nesse trabalho como uma proteína relacionada ao metabolismo, por sua importante função como intermediário da glicólise. Essa proteína, porém, também está presente como intermediário na rota de fotossíntese e na via 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP), que é responsável pela biossíntese de isopentenil difosfato, sendo parte representativa da via de formação de terpenos (CHAMPAGNE e BOUTRY, 2017). Dessa forma, a maior expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase identificada nesse trabalho pode indicar variações biossintéticas para além do metabolismo primário.

O fator de transcrição WRKY também foi uma proteína identificada (dados não mostrados) e teve sua expressão maior em triploides enquanto a expressão se mantinha nas demais ploidias, em comparação ao acesso diploide. Essa proteína participa do controle de expressão de vários genes operando como reguladores positivos ou negativos em várias combinações. O fator de transcrição WRKY está relacionado com processos de defesa contra patógenos, mudanças metabólicas

extensas, desenvolvimento de tricomas, entre outras funções (Bakshi e Oelmüller, 2014).

Como podemos perceber de acordo com os exemplos dados, as análises de função de proteínas, para além de suas vias clássicas, corroboram a ideia de que modificações de metabolismo secundário podem ocorrer de maneira significativa, principalmente em triploides. No entanto, estudos voltados para o metabolismo secundário e um número maior de identificações de proteínas precisam ser realizados como forma de esclarecimentos desses fatos.

De forma geral, as informações obtidas neste trabalho, mesmo que iniciais, acrescentam dados que contribuem para o estudo da formação do complexo poliploide de *Lippia alba*. Paralelamente, os dados contribuem para melhor o controle de suas propriedades fitoterápicas e comerciais além de servirem de base para a elaboração de estratégias de melhoramento genético. Os dados indicam certas semelhanças entre os acessos, com exceção do acesso triploide, essencialmente em relação ao metabolismo primário da espécie. Porém, as diferenças encontradas entre as ploidias não podem ser descartadas. A identificação de um número maior de proteínas, ainda mostra-se necessária para se caracterizar o perfil proteico das ploidias analisadas.

6 CONCLUSÃO

O objeto de estudo deste trabalho foi *Lippia alba*, uma planta poliploide, não modelo e não cultivada, presente em todas as regiões do Brasil, com propriedades medicinais conhecidas, de interesse comercial e grande utilização popular. Neste contexto, os estudos de *Lippia alba* mostram-se importantes dentro de várias áreas de conhecimento. A aplicação de estudos proteômicos, por meio de géis bidimensionais e espectrometria de massas como proposta neste trabalho, possibilita uma nova forma de contribuição para a compreensão da formação do complexo poliploide descrito para a espécie. Além disso, esses estudos contribuem para o enriquecimento dos estudos de poliploidia e para o aumento do conhecimento de *L. alba* e suas rotas biossintéticas.

Nesse trabalho, foi realizada a primeira análise proteômica de *L. alba*, que embora possua várias propriedades de interesse econômico, principalmente por se tratar de uma planta medicinal, representa um complexo poliploide ainda pouco estudado. Os resultados obtidos dessa análise permitiram uma compreensão inicial das variações proteicas existentes em acessos de *L. alba*, em resposta às suas variações genômicas. Foram observadas diferenças de expressão qualitativas e quantitativas dos *spots* analisados. A análise de expressão das proteínas identificadas, nesse trabalho, permitiu a observação de semelhanças no comportamento das proteínas de metabolismo primário nas ploidias estudadas, com exceção do acesso triploide. Por se tratar de um estudo inicial, ainda são necessárias mais análises para certificação dos padrões encontrados e para obtenção de avanços em novas questões levantadas com relação a divergências que podem ser encontradas no metabolismo secundário.

7 PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho e os questionamentos oriundos de sua realização, faz-se necessário ampliar a identificação de proteínas dos acessos das diferentes ploidias de *Lippia alba*. Para tal finalidade algumas modificações poderiam ser realizadas nos novos estudos proteômicos. Um novo estudo proteômico de folhas poderia ser realizado utilizando protocolos de retirada da proteína rubisco a fim de se obter melhor identificação das demais proteínas presentes nas folhas. Por outro lado, pensando em um estudo mais direcionado, poderia ser realizada uma análise proteômica apenas de seus tricomas glandulares. Dessa forma, seria possível a identificação de uma maior quantidade de proteínas relacionada à via de formação de terpenos, os metabólitos secundários de maior interesse dessa espécie. Paralelamente aos estudos proteômicos, a realização de estudos qualitativos e quantitativos do conteúdo dos óleos essenciais das ploidias permitiria uma análise mais substancial e completa das possíveis variações existentes. Por fim, a comparação dos resultados de todas as ploidias entre si poderá trazer novas informações sobre as consequências das variações genômicas existentes em *Lippia alba*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, P.; LATEF, A.A.H.A.; RASOOL, S.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M.; GUCEL, S. Role of Proteomics in Crop Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. 1336, p.1-14, 2016.

AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, n.2, p.239-244, 2011.

AHSAN, N.; RAO, R.S.; GRUPPUSO, P.A.; RAMRATNAM, B.; SALOMON, A.R. Targeted proteomics: Current status and future perspectives for quantification of food allergens. *Journal of Proteomics*, v. 143, p. 15-23, 2016.

ALBERTIN, W.; BRABANT, P.; CATRICE, O.; EBER, F.; JENCZEWSKI, E.; CHÈVRE, A.M; THIELLEMENT, H. Autopolyploidy in cabbage (*Brassica oleracea* L.) does not alter significantly the proteomes of green tissues. *Proteomics*, v. 5, p. 2131–2139, 2005.

AN, F.; FAN, J.; LI, J.; LI, Q.X.; LI, K.; ZHU, W.; WEN, F.; CARVALHO, L.J.C.B.; CHEN, S. Comparison of Leaf Proteomes of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Cultivar NZ199 Diploid and Autotetraploid Genotypes. *Plos One*, v.9, n.4, e85991, 2014.

BARBOZA, G.E.; CANTERO, J.J.; NUNEZ, C.; PACCIARONI, A.; ESPINAR, L.A. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, v. 34, n. 1-2, p. 7-365, 2009.

BAKSHI, M.; OELMÜLLER, R. WRKY transcription factors: Jack of many trades in plants. *Plant Signaling and Behavior*, v.9, n. 2, p. e27700, 2014.

BLANK, A.F.; CAMELO, L.C.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PINHEIRO, J.B.; ANDRADE, T.M.; NICULAU, E.S.; ALVES, P.B. Chemical Diversity in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Germplasm. *The e Scientific World Journal*, v. 2015, p. 1-11, 2015.

BRACHER, A.; WHITNEY, S.M.; HARTL, F.U.; HAYER-HARTL, M. Biogenesis and Metabolic Maintenance of Rubisco. *Annual Review of Plant Biology*, v. 68, p. 29-60, 2016.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n.1, p. 248-254, 1976.

BRYANT, L.; PATOLE, C.; CRAMER, R. Proteomic analysis of the medicinal plant *Artemisia annua*: Data from leaf and trichome extracts. *Data in Brief*, v. 7, p. 325-331, 2016.

CARPENTIER, S.C., WITTERS, E., LAUKENS, K., DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, v.5, n.10, p.2497-507, 2005.

CASTRO-RODRÍGUEZ, V.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, A.; CAÑAS, R.A.; PASCUAL, M.B.; AVILA, C.; CÁNOVAS, F.M. Redundancy and metabolic function of the glutamine synthetase gene family in poplar. *BMC Plant Biology*, v. 15, n.20, p. 2-14, 2015.

CHAMPAGNE, A.; BOUTRY, M. Proteomics of nonmodel plant species. *Proteomics*, v. 13, p. 663-673, 2013.

CHAMPAGNE, A.; BOUTRY, M. Proteomics of terpenoid biosynthesis and secretion in trichomes of higher plant species. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.8, p. 1039-1049, 2016.

CHAMPAGNE, A.; BOUTRY, M.. A comprehensive proteome map of glandular trichomes of hop (*Humulus lupulus* L.) female cones: Identification of biosynthetic pathways of the major terpenoid-related compounds and possible transport proteins. *Proteomic*, v.17, n. 8, 2017.

CHUECA, A.; SAHRAWY, M.; PAGANO, E.A.; LÓPEZ GORGÉ, J. Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: structure and function. *Photosynthesis Research*, v.74, n.3, p. 235-49, 2002.

CIFANI, P.; KENTISIS, A.. Towards comprehensive and quantitative proteomics for diagnosis and therapy of human disease. *Proteomics*. v. 17, p. 1-24, 2017.

COLLIN, H. A. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, v.34, p.119-134, 2001.

DONG, Y.; DENG, M.; ZHAO, Z.; FAN, G. Quantitative Proteomic and Transcriptomic Study on Autotetraploid Paulownia and Its Diploid Parent Reveal Key Metabolic Processes Associated with Paulownia Autotetraploidization. *Frontiers in Plant Science*, v.7, p.892, 2016.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 4-29, 2016.

ELDAKAK, M.; MILAD, S.I.M.; NAWAR, A.I.; ROHILA, J.S. Proteomics: a biotechnology tool for crop improvement. *Frontier Plant Science*, v.4, 35, 2013.

FINBOW, M.E.; HARRISON, M.A. The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochemical Journal*, v. 324, n. 3, p. 697–712, 1997.

FUKAO, Y. Protein-protein interactions in plants. *Plant Cell Physiology*, v. 53, n.4, p. 617-625, 2012.

GIBSON, D. N. Verbenaceae, Flora of Guatemala,. In P. C. Standley and L. O. Williams (Eds.), Fieldiana Botany, part IX: n. 1 e 2, v. 6., p. 167, 1970.

GLAMOCLIJA, J.; SOKOVIC, M.; TESEVIC, V.; LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B. Chemical Characterization of *Lippia alba* essential oil: an alternative to control green molds. Brazilian Journal of Microbiology, v.42, p.1537-1546, 2011.

GEMPERLINE, E. KELLER, C.; LI, L.. Mass Spectrometry in Plant-omics. Analytical Chemistry, v. 88, p. 3422-3434, 2016.

GOMES, J.V.D; FAITANIN, R.D.; BRASILEIRO, B.G.; SILVEIRA, D.; JAMAL, C.M. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades trombolítica e citotóxica de *Cecropia hololeuca* MIQ (Urticaceae), *Lippia alba* (MILL) N.E.BR EX P. WILSON (Verbenaceae) *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae). Infarma, v. 28, n. 1, p.10-15, 2016.

HAKHEEM, K.R.; CHANDNA, R.; AHMAD, P.; IQBAL, M.; OZTURK. Relevance of Proteomic Investigations in Plant Abiotic Stress Physiology. OMICS A Journal of Integrative Biology, v.16, n.11, p. 621-635, 2012.

HAMMOND, J.W.; CAI, D.; VERHEY, K.J. Tubulin modifications and their cellular functions. Current Opinion Cell Biology, v. 20, n.1, p. 71-76, 2008.

HARTL, F.U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature, n. 475, p.324–332, 2011.

Healthcare, Handbooks from GE. 2-D electrophoresis: Principles and Methods, p. 162, 2004.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. Journal of Ethnopharmacology, v.116, p. 211–222, 2008.

HU, G.; HOUSTON, N.L.; PATHAK, D.; SCHMIDT, L.; THELEN, J.J; WENDEL, J. Genomically Biased Accumulation of Seed Storage Proteins in Allopolyploid Cotton. Genetics, v.189, p. 1103–1115, 2011.

HU, J.; RAMPITSCH, C.; BYKOVA, N.V. Advances in plant proteomics toward improvement of crop productivity and stress resistance. Frontiers in Plant Science, v.6, a. 209, 2015.

HUGHES, C.E.; PENNINGTON, R.T.; A. ANTONELLI. Neotropical plant evolution: Assembling the big picture. Botanical Journal of the Linnean Society v. 171, p.1-18, 2013.

HUSCHEK, G.; BEONICK, J.; LEOWESTEIN, Y.; SIEVERS, S.; RAWEL, H. Quantification of allergenic plant traces in baked products by targeted proteomics using isotope marked peptides. Food Science and Technology, v. 74, p. 286-293, 2016.

JORRÍN-NOVO, J.V.; PASCUAL, J.; SÁNCHEZ-LUCAS, R.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M.C.; RODRÍGUEZ-ORTEGA, M.J.; LENZ, C.; VALLEDOR, L. Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. *Proteomics*, v. 15, p. 1089-1112, 2015.

KIM, S.W.; GUPTA, R.; LEE, S.H.; MIN, C.W.; AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; KIM, J.B.; JO, I.H.; PARK, S.; KIM, J.K.; KIM, Y.; BANG, K.H.; KIM, S.T. An Integrated Biochemical, Proteomics, and Metabolomics Approach for Supporting Medicinal Value of *Panax ginseng* Fruits. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 994, 2016.

LIMA, A. S., DE CARVALHO, J.F, PEIXOTO, M.G., BLANK, A.F.; BORGES, L.M.; COSTA JUNIOR, L.M. Assessment of the repellent effect of *Lippia alba* essential oil and major monoterpenes on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 30, p. 73-77, 2016.

LOYD, A.; BOMBLIES, K. Meiosis in autopolyploid and allopolyploid Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, v.30, p.116-122, 2016.

MANICA-CATTANI, M.F.; ZACARIA, J.; PAULETTI, G.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology*, v. 69, n.2, p. 375-380, 2009.

MARTINEZ-ESTESO, M.J.; MARTINEZ-MARQUES, A.; SELLES-MARCHART, S.; MORANTE-CARRIEL, J.A.; BRU-MARTINEZ, R. The role of proteomics in progressing insights into plant secondary metabolism. *Frontiers in Plant Science*, v.6, 504, 2015.

MENG, F.; LUO, Q.; WANG, Q.; ZHANG, X.; QI, Z.; XU, F.; LEI, X.; CAO, Y.; CHOW, W.S.; SUN, G. Physiological and proteomic responses to salt stress in chloroplasts of diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Scientific Reports*, v.6, p. 23098, 2016.

MONTERO-VILLEGAS, S.; POLO, M.; GALLE, M.; RODENAK-KLADNIEWL, B.; CASTRO, M.; VES-LOSADA, A.; CRESPO, R.; BRAVO, M.G. Inhibition of Mevalonate Pathway and Synthesis of the Storage Lipids in Human Liver-Derived and Non-liver Cell Lines by *Lippia alba* Essential Oil. *Lipids*, v. 52, p.37-49, 2017.

NARULA, K.; PANDEY, A; GAYALI, S.; CHAKRABORTY, N.; CHAKRABORTY, S. Birth of plant proteomics in India: a new horizon. *Journal of Proteomics*, v. 127, p.34-43, 2015.

NESVIZHSKII, A.I.; KELLER, A.; KOLKER, E.; ABERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v.75, p.17, p.4646-4658, 2003.

NG, DW, ZHANG, C.; MILLER, M.; SHEN, Z.; BRIGGS, S.P.; CHEN, Z.J. Proteomic divergence in Arabidopsis autopolyploids and allopolyploids and their progenitors *Heredity*, v.108, p. 419–430, 2012.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, v. 405, p. 837-846, 2000.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v.3, n.4, p.146-152, 2012.

PIERRE, P.M.O.; SOUSA, S.M.; DAVIDE, L.C.; MACHADO, M.A.; VICCINI, L.C. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Anais Acadêmia Brasil Ciências*, v.83, p.993–1005, 2011.

REFLORA - Herbário Virtual. *Lippia* em Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual>. Acesso em 10/06/2017.

REIS, A.C.; SOUSA, S.M.; VALE, A.A.; PIERRE, P.M.; FRANCO, A.L.; CAMPOS, J.M.S.C.; VIEIRA, R.F.; VICCINI, L.F. *LIPPIA ALBA* (VERBENACEAE): A NEW TROPICAL AUTOPOLYPLOID COMPLEX? *American Journal of Botany*, v. 101, n. 6, p. 1002-1012, 2014.

REIS, A.C.; SOUSA, S.M.; VICCINI, L.F. High frequency of cytomixis observed at zygotene in tetraploid *Lippia alba*. *Plant Syst Evol*, v. 302, p. 121-127, 2016.

REMMERIE, N.; DE VIJLDER, T.; LAUKENS, K.; DANG, T.H.; MERTENS, I.; VALKENBORG, D.; BLUST, R.; WITTERS, E. Next generation functional proteomics in non-model plants: A survey on techniques and applications for the analysis of protein complexes and post-translational modifications. *Phytochemistry*, v.72, p. 1192–1218, 2011.

RIGHETTI, P.G.; BOSCHETTI, E. Global proteome analysis in plants by means of peptide libraries and applications. *Journal of Proteomics*, v. 143, p. 3-14, 2016.

ROBERTSON, J. M. e CHAN, L. M. Species richness in a tropical biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography* 38, p. 2043-2044, 2011.

ROCHA, D.S.; SANTOS, C.P.; BAJAY, M.M.; CAMPOS, J.B.; BLANK, A.F.; PINHEIRO, J.B.; ZUCCHI, M.I. Development of a novel set of microsatellite markers for *Lippia alba* (Verbenaceae). *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n.1, p. 971-974, 2015.

ROMERO-BENAVIDES, J.C.; RUANO, A.L.; SILVA-RIVAS, R.; CASTILLO-VEITTIMILLA, P.; VIVANCO-JARAMILLO, S.; BAILON-MOSCOSO, N. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 129, p. 209-217, 2017.

SANTOS, F.R.C.; LIMA, P.F.; PRIOLLI, R.H.G.; SIQUEIRA, W.J.; COLOMBO, C.A. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci in *Lippia alba* (Verbenaceae). *American Journal of Botany*, v.99, p. e301–e303, 2012.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Eds.). Farmacognosia - da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/Ed.da UFSC, 2000. p.323-354.

SATTLER, M.C.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, v. 243, n.2, p.281-296, 2016.

SHEN, Y.; ZHANG, Y.; ZOU, J.; MENG, J.; WANG, J. Comparative proteomic study on Brassica hexaploid and its parents provides new insights into the effects of polyploidization. *Journal of Proteomics*, v.112, p. 274-284, 2015.

SHENA, Y.; ZHANG, Y.; ZOU, J.; MENG, J.; WANG, J. Comparative proteomic study on Brassica hexaploid and its parents provides new insights into the effects of polyploidization. *Journal of Proteomics*, v. 112, p. 274-284, 2015.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature*, v. 1, p. 2856-2860, 2006.

SOUSA, S.M.; PIERRE, P.M.O.; TORRES, G.A.T; DAVIDE, L.C.; VICCINI, L.F. Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.85, n.1, p.147-157, 2013.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R.. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SOLTIS, D.E.; MISRA, B.B.; SHAN, S.; CHEN, S.; SOLTIS, P.S. Polyploidy and the proteome. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1864, n. 8, p. 896-907, 2016.

TIMÓTEO, P.; KARIOTI, A.; LEITÃO, S.G.; VINCIERI, F.F.; BILIA, A.R. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. *Food Chemistry*, v. 175, p. 366-373, 2014.

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.

VICCINI, L.F.; PIERRE, P.M.O., PRAÇA, M.M.; COSTA, D.C.S; ROMANEL, E.C.; SOUSA, S.M.; PEIXOTO, P.H.P.P.; SALIMENA, F.R.G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 256, p.171-178, 2006.

VICCINI, L.F.; SILVEIRA, R.S.; VALE, A.A.; CAMPOS, J.M.S; REIS, A.C.; SANTOS, M.O.; CAMPOS, V.R.; CARPANEZ, A.G.; GRAZUL, R.M. Citral and linalool content

has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *Industrial Crops and Products*, v.59, P.14-19, 2014.

WANG, S.; CHEN, W.; YANG, C.; YAO, J.; XIAO, W.; XIN, Y.; QIU, J.; HU, W.; YAO, H.; YING, W.; FU, Y.; TONG, J.; CHEN, Z.; RUAN, S.; MA, H. Comparative proteomic analysis reveals alterations in development and photosynthesis-related proteins in diploid and triploid rice. *BMC Plant Biology*, v.16, p.199-209, 2016.

WANG, X.; CHENG, Z.-M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding triploid plants: a review. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, v. 52, p. 41–54, 2016.

WANG, Z.; FAN, G.; DONG, Y.; ZHAI, X.; DENG, M.; ZHAO, Z.; LIU, W.; CAO, Y. Implications of polyploidy events on the phenotype, microstructure, and proteome of *Paulownia australis*. *Plos One*, v.12, n.3; p. e0172633, 2017.

WANG, Z.; WANG, M.; LIU, L.; MENG, F. Physiological and Proteomic Responses of Diploid and Tetraploid Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) Subjected to Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, p. 20299-20325, 2013.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.L; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

YOO, M.G.; LIU, X.; PIRES, J.C.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. Nonadditive gene expression in polyploids. *Annual Review of Genetics*, v. 48, p. 485–517, 2014.

ZHANG, X.L.; ZHANG, J.; GUO, Y.H.; SUN, P.; JIA, H.X.; FAN, W.; LU, M.Z; HU, J.J. Comparative Proteomic Analysis of Mature Pollen in Triploid and Diploid *Populus deltoids*. *Int. J. Mol. Sci.*, v.108, n.4, p. 419-430, 2016.

APÊNDICE A

QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976) e a absorvância foi verificada em espectrofotômetro. Foi utilizada Albumina de soro bovino (BSA) (promega - R396D) como padrão para a quantificação das proteínas. Uma solução estoque de BSA foi então preparada a 1mg/mL e, a partir destas soluções, preparou-se diluições seriadas com as seguintes concentrações: 0mg/mL, 0,25mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75mg/mL, 1mg/mL (Tabela 1).

Cada leitura de absorvância foi realizada com 5µL de amostra adicionado a 250µL de Bradford (sigma B6916) pipetados em placa de 96 poços, agitados por 30 segundos e avaliados com o comprimento de onda de 595nm.

Tabela 1- Diluição de BSA a partir de soluções estoques de 1 mg/mL para o preparo da curva de calibração da quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

| Concentração final de BSA (mg/mL) | Quantidade de BSA (1 mg/mL) | Quantidade de tampão (água MilliQ) |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 0 mg/mL | 0 µL | 200 µL |
| 0,25 mg/mL | 5 µL | 195 µL |
| 0,5 mg/mL | 10 µL | 190 µL |
| 0,75 mg/mL | 15 µL | 185 µL |
| 1 mg/mL | 20 µL | 180 µL |

Os valores de absorvância em relação à concentração de BSA foram plotados em gráfico obtendo a curva padrão de BSA (Figura 4). Pela equação da reta ($y = 0,5315x + 0,0284$) calculou-se a concentração das amostras, em que o valor de y a absorvância e x o valor da concentração proteica.

A fim de se obter valores aceitáveis dentro dos pontos da curva padrão de BSA, foram realizadas diluições das amostras de proteínas de *Lippia alba* de forma

a permitir a quantificação pelo Método de Bradford. Obteve-se valores compatíveis com a curva padrão de BSA na diluição de 1:30.

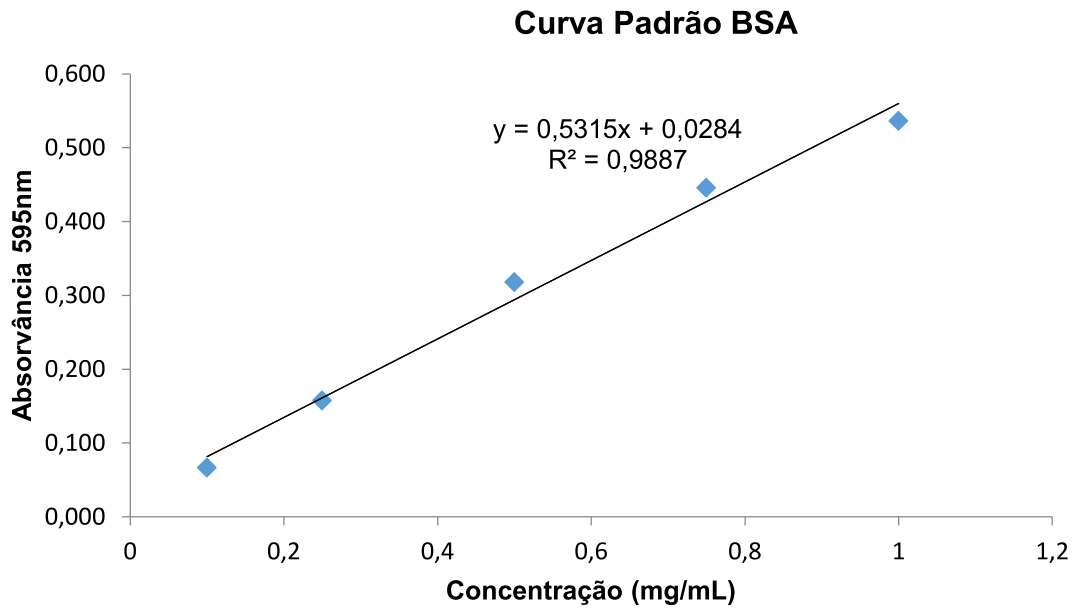


Figura 1 - Curva de calibração para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

APÊNDICE B

Imagens Géis Bidimensionais de proteínas de folhas de *Lippia alba*

Todos os fracionamentos protéicos foram realizados em tiras de poliacrilamida com gradiente imobilizado de pH 4-7 (18 cm). A SDS-PAGE foi realizada com géis de 12.5% de poliacrilamida.

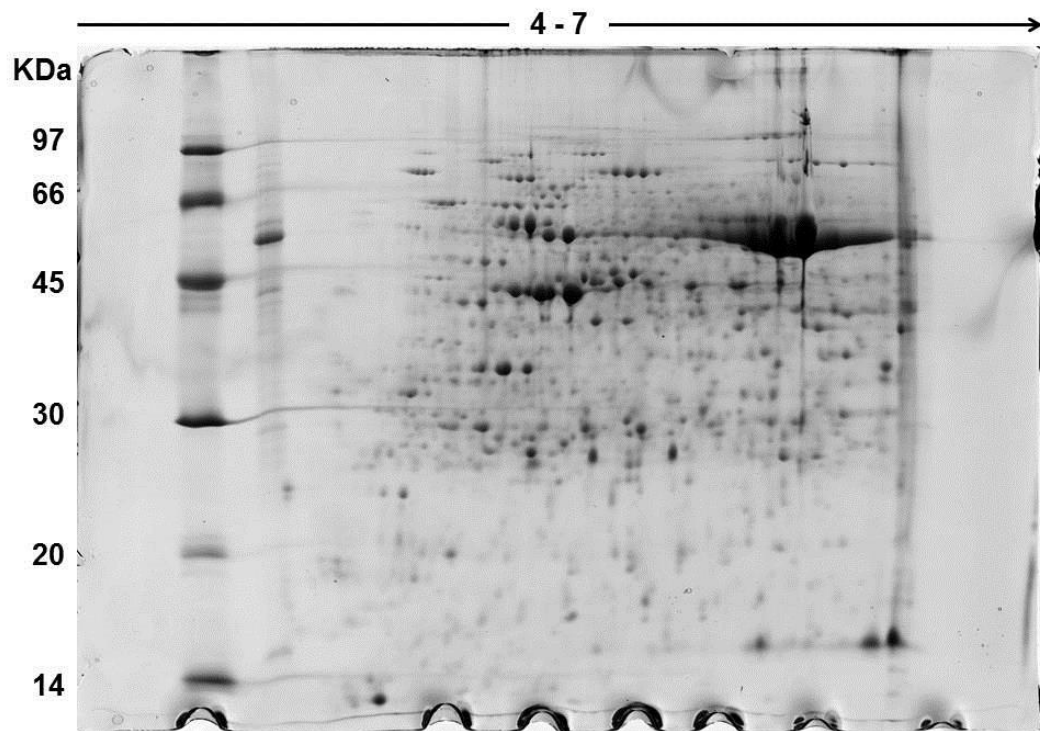


Figura 1 - Gel bidimensional (58361) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-22 diploide) repetição 1.

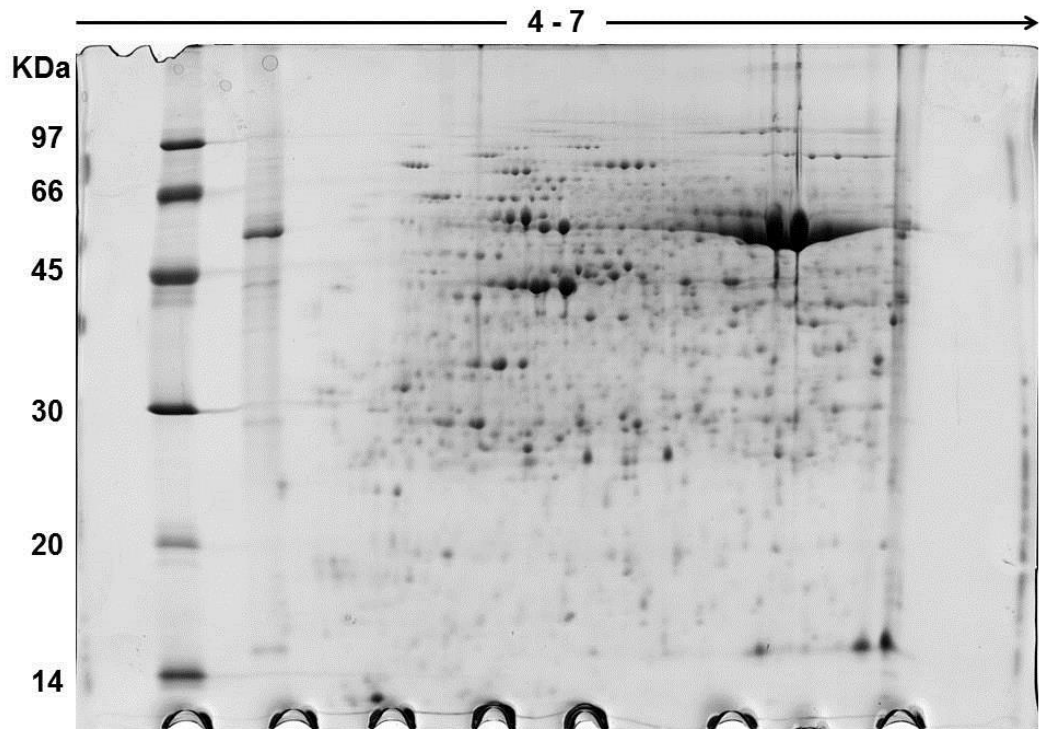


Figura 2 - Gel bidimensional (58362) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-22 diploide) repetição 2.

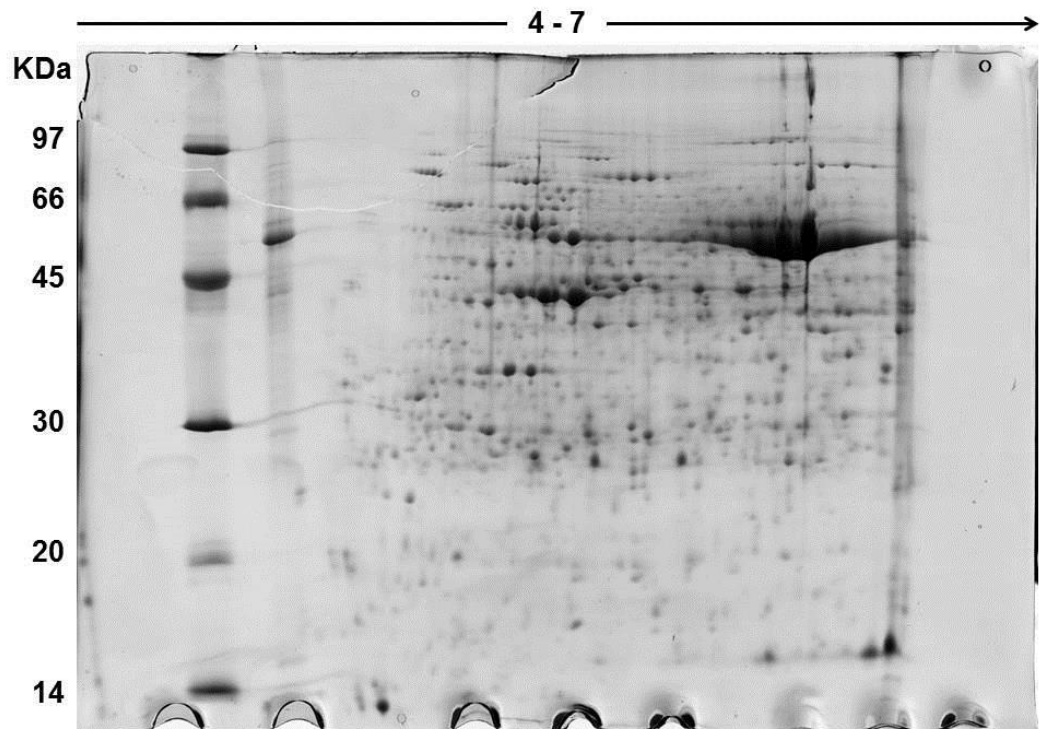


Figura 3 - Gel bidimensional (58363) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-22 diploide) repetição 3.

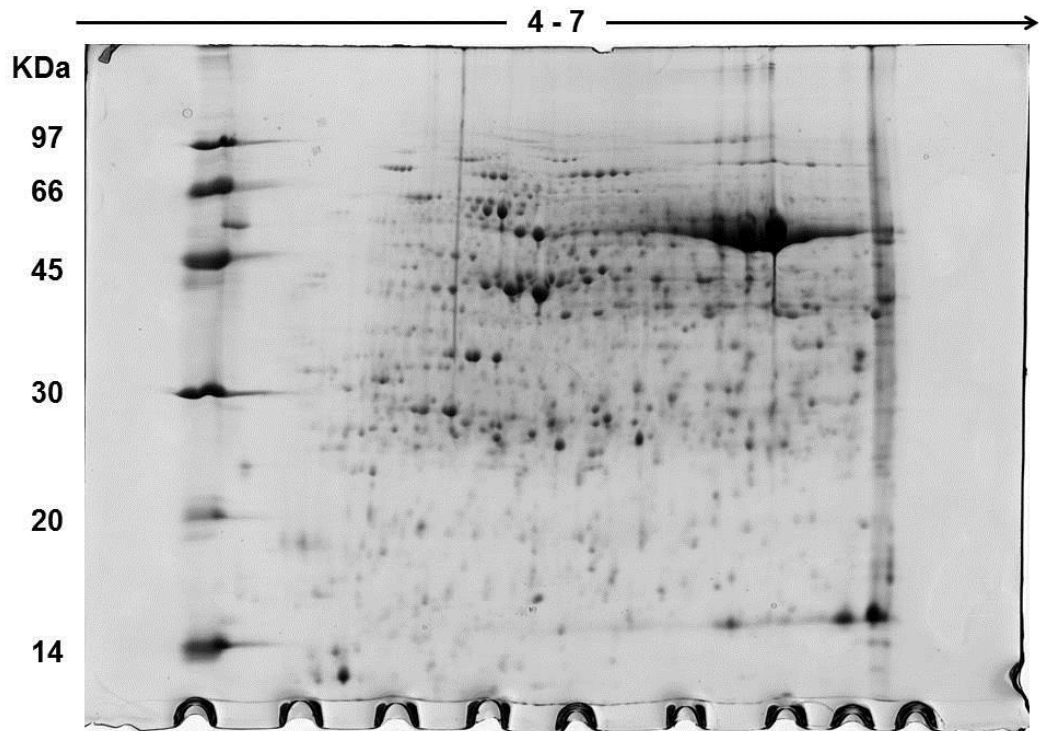


Figura 4 - Gel bidimensional (58358) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-16 aneuploide) repetição 1.

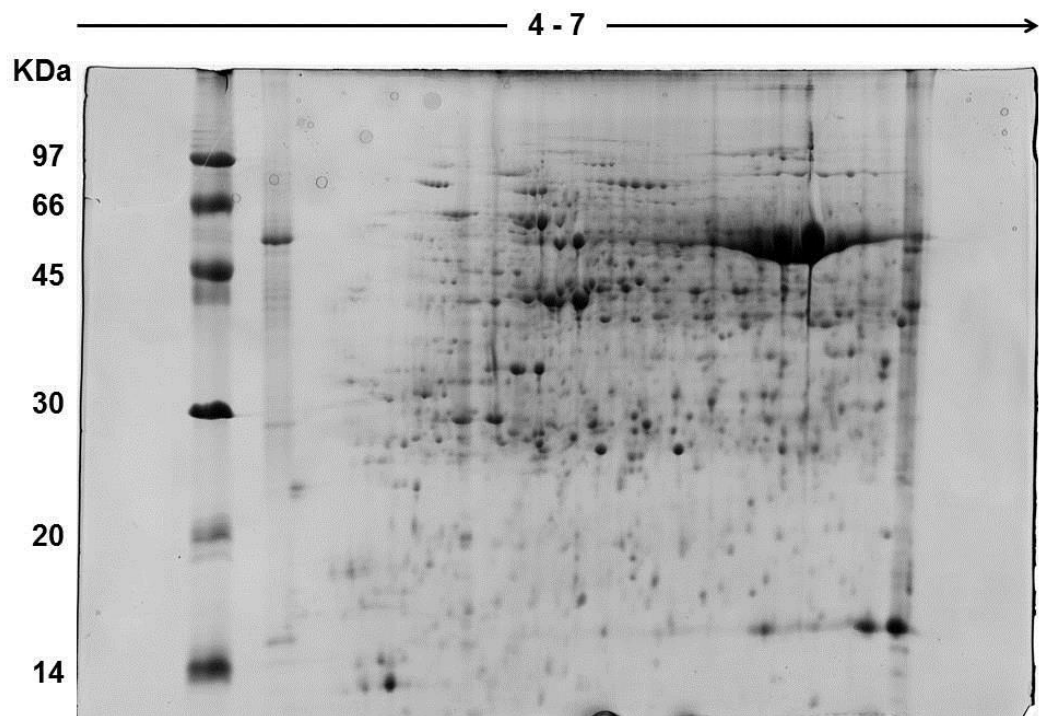


Figura 5 - Gel bidimensional (58359) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-16 aneuploide) repetição 2.

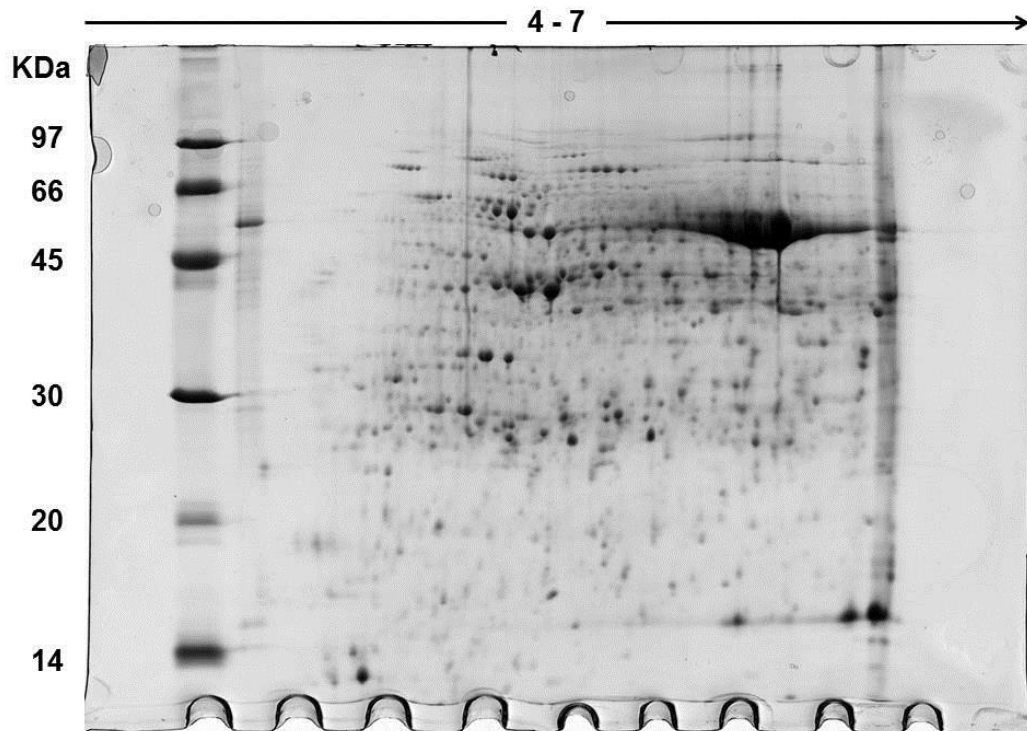


Figura 6 - Gel bidimensional (58360) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-16 aneuploide) repetição 3.

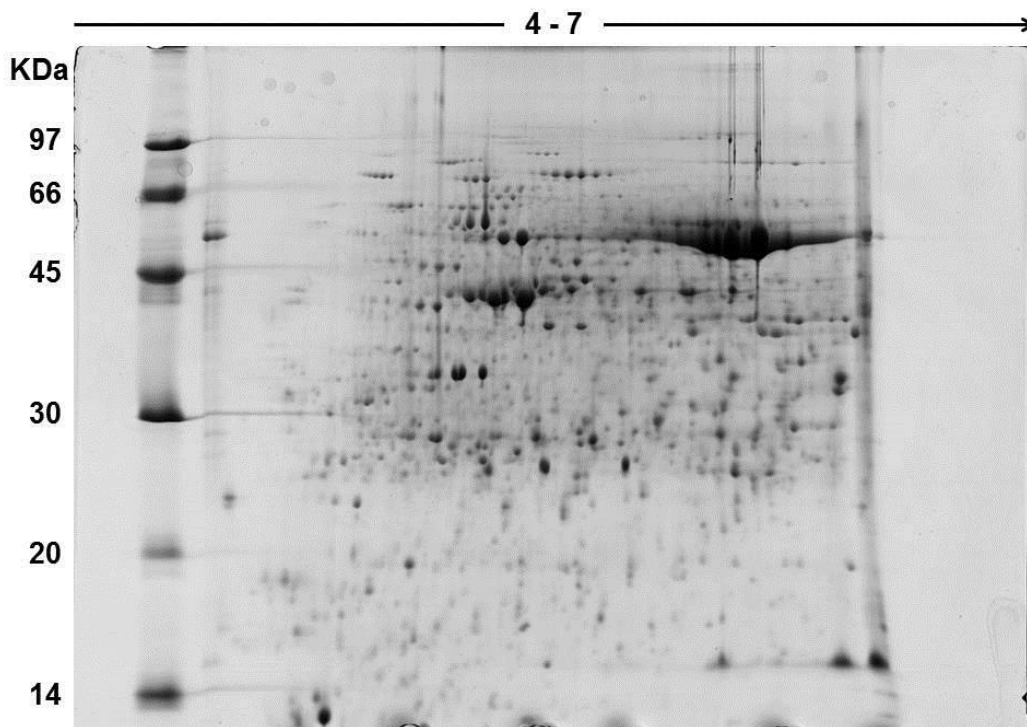


Figura 7 - Gel bidimensional (58355) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-23 triploide) repetição 1.

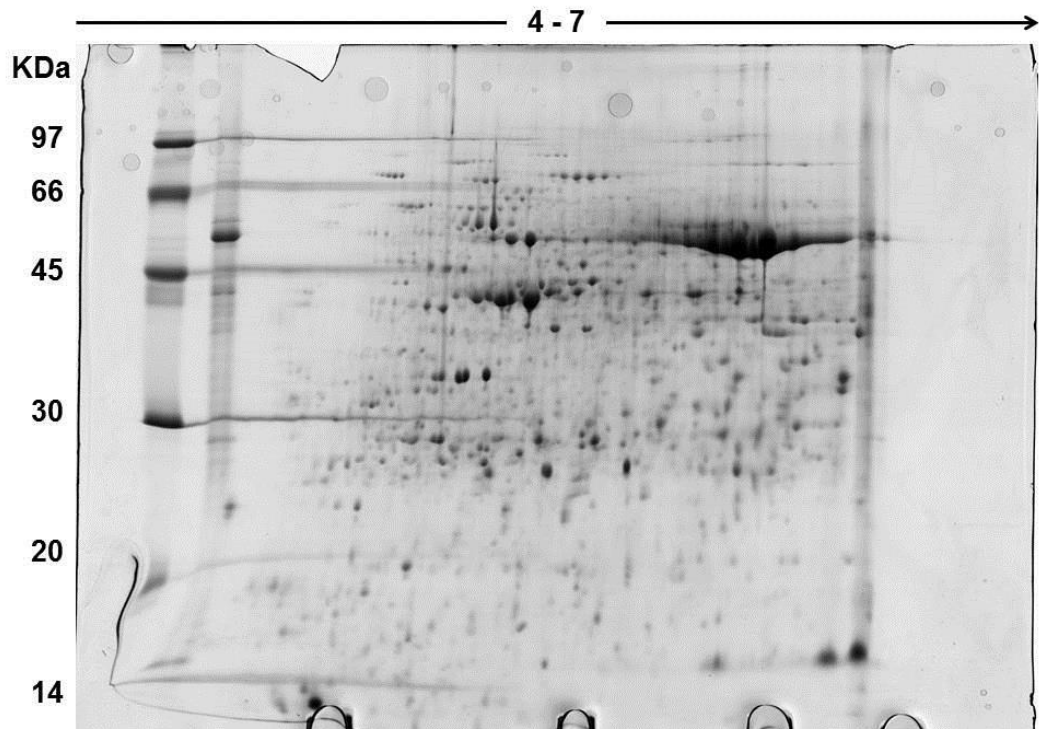


Figura 8 - Gel bidimensional (58356) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-23 triploide) repetição 2.

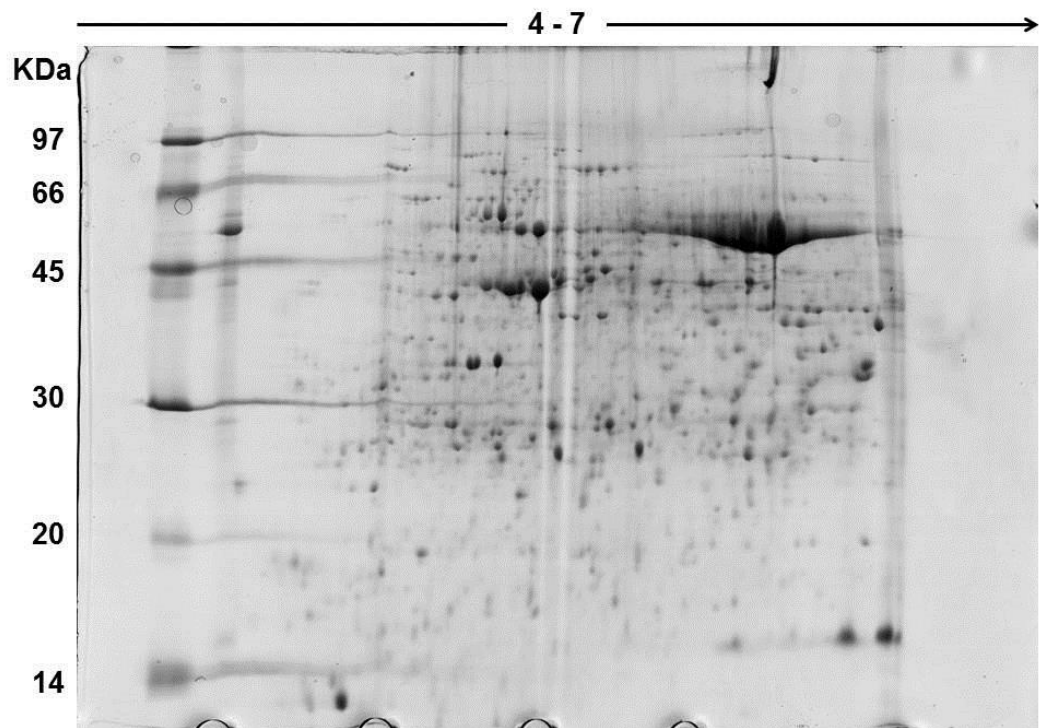


Figura 9 - Gel bidimensional (58357) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-23 triploide) repetição 3.

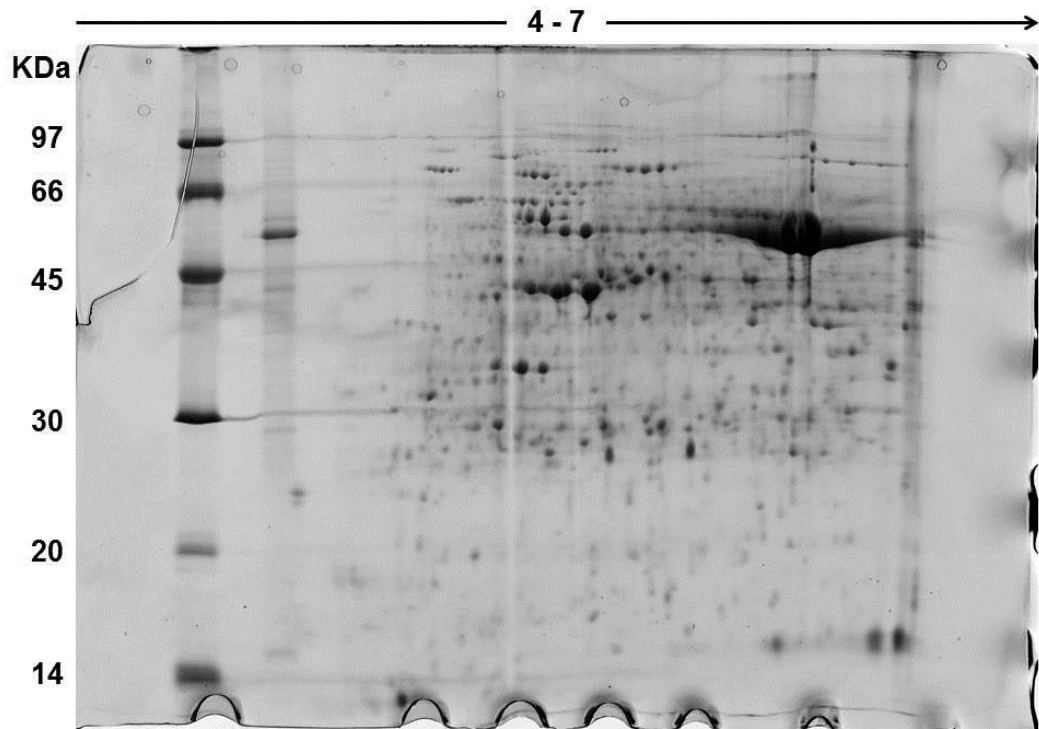


Figura 10 - Gel bidimensional (58364) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-31 tetraploide) repetição 1.

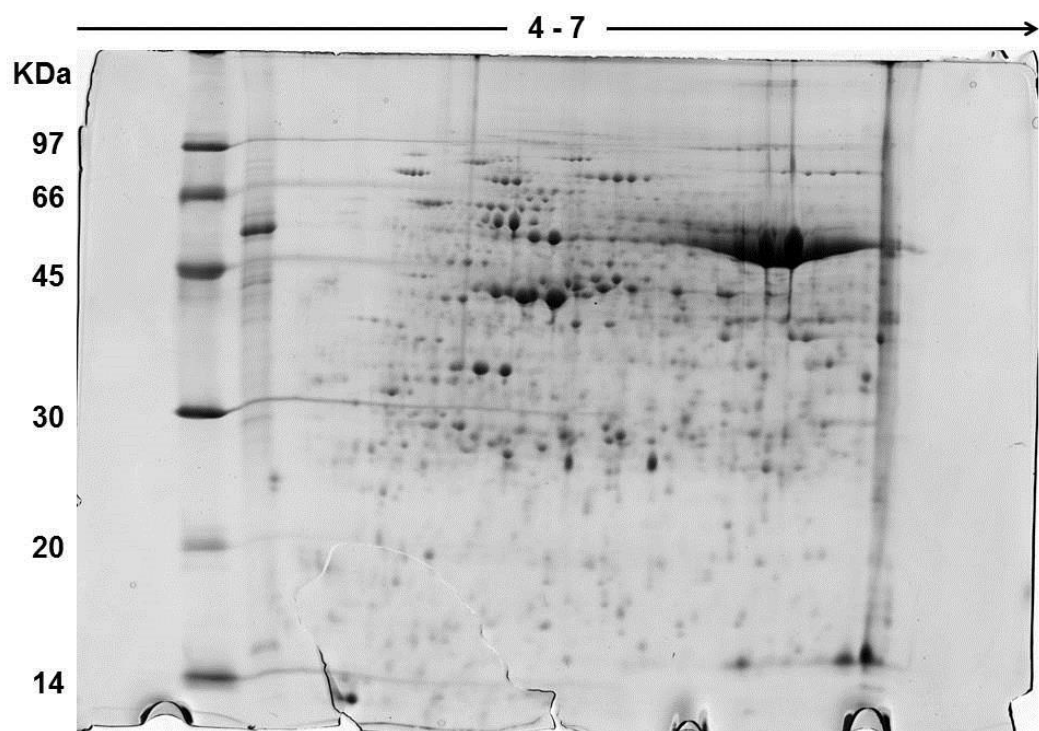


Figura 11 - Gel bidimensional (58365) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-31 tetraploide) repetição 2.

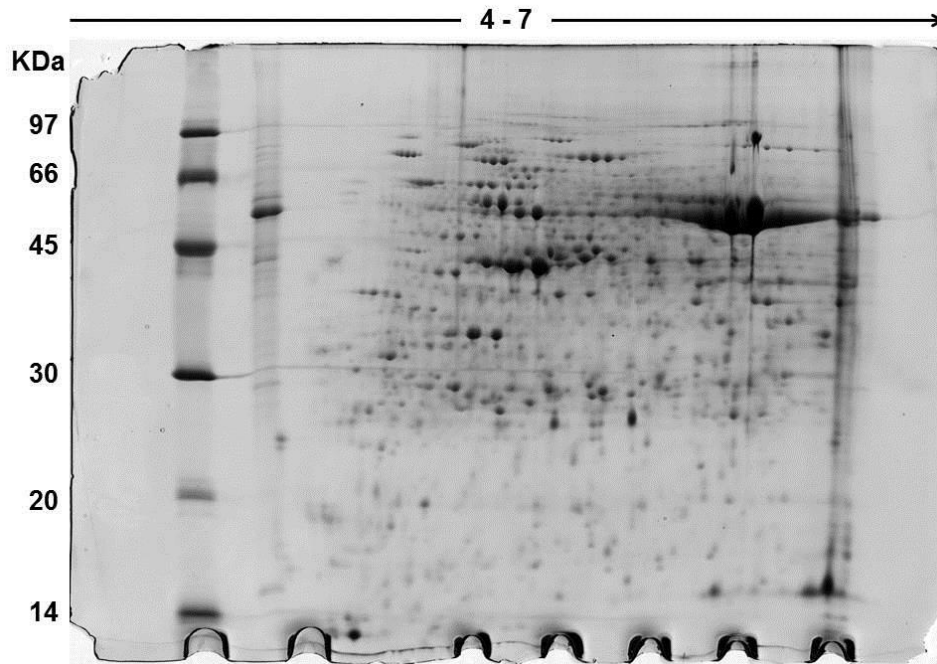


Figura 12 - Gel bidimensional (58367) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-31 tetraploide) repetição 3.

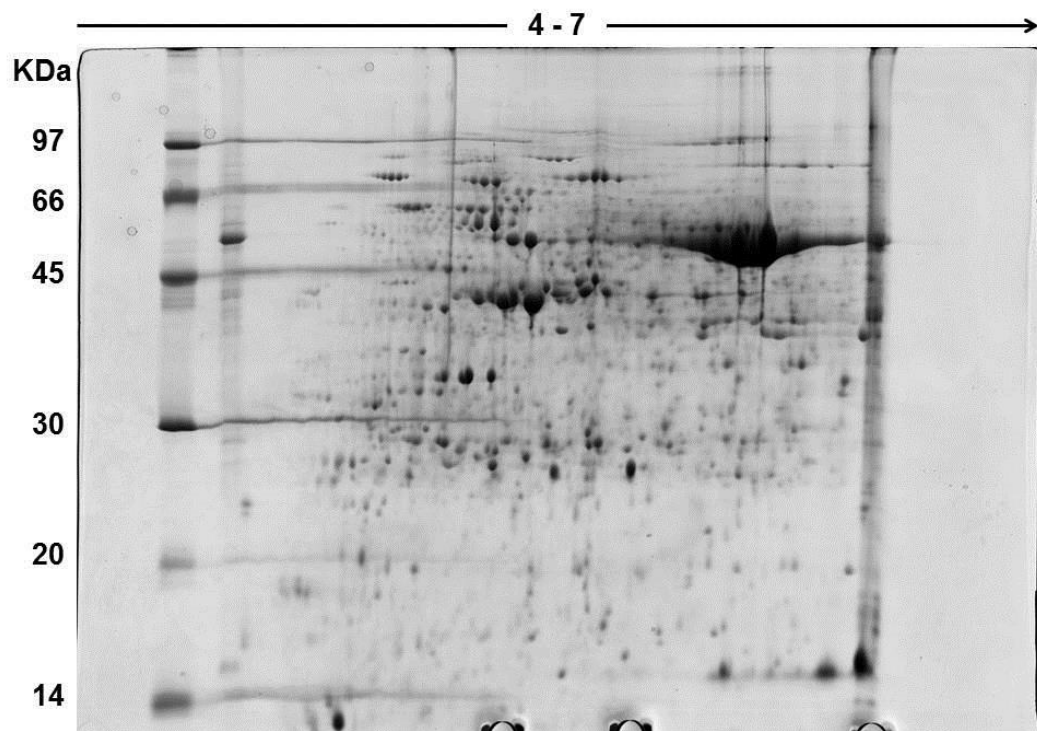


Figura 13 - Gel bidimensional (58377) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-42 hexaploide) repetição 1.

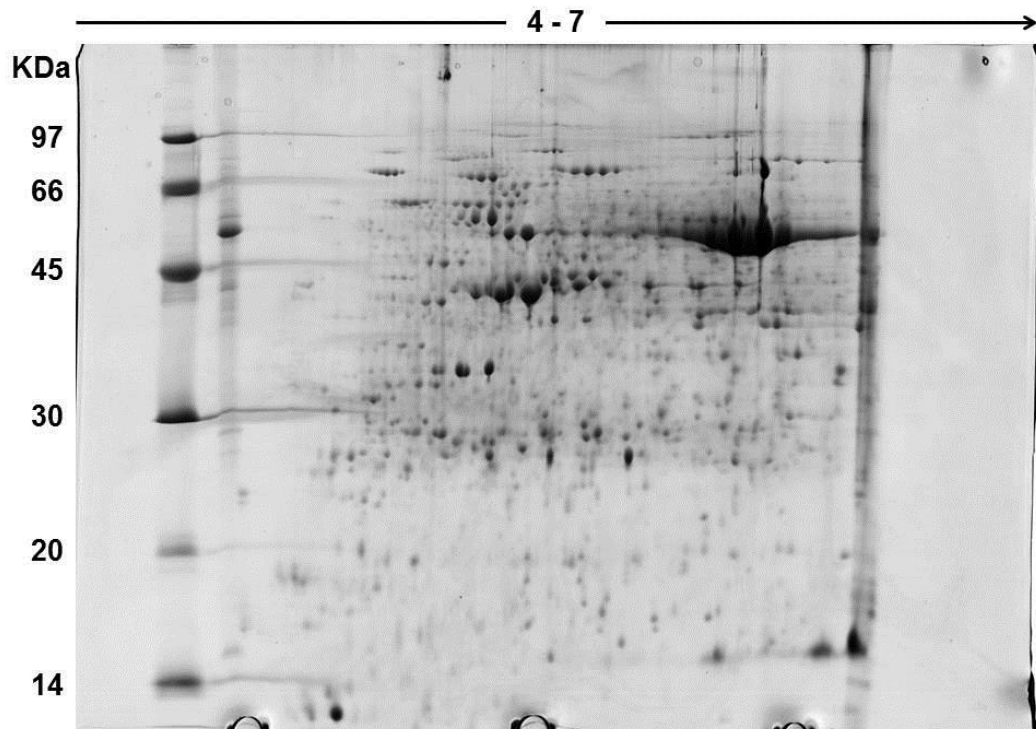


Figura 14 - Gel bidimensional (58378) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-42 hexaploide) repetição 2.

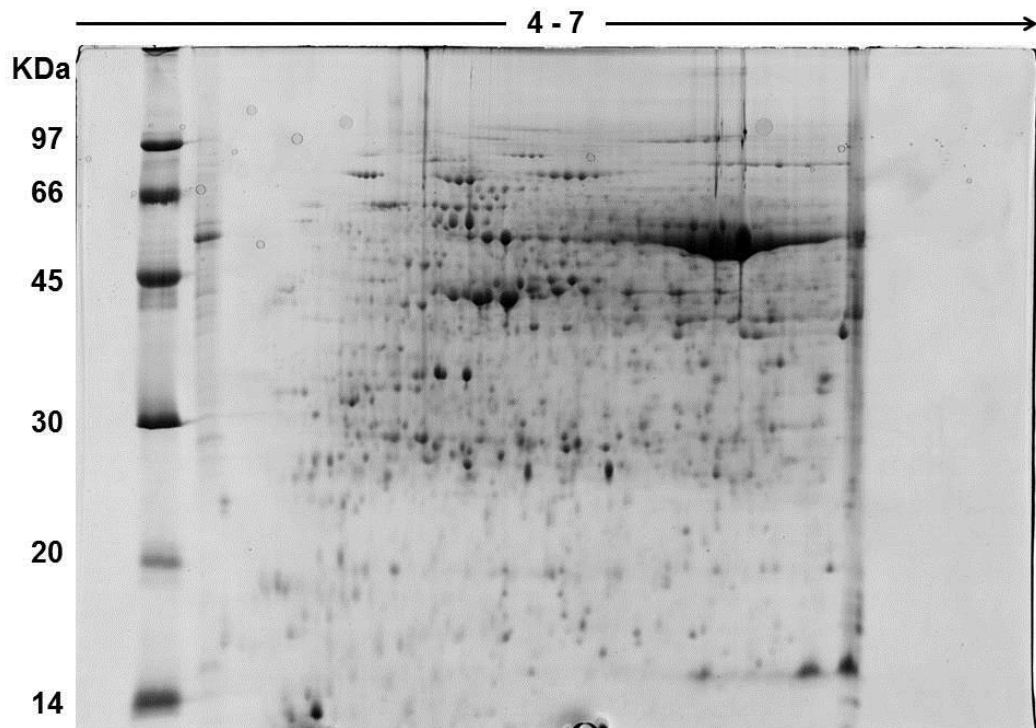


Figura 15 - Gel bidimensional (58379) de proteínas de folhas de *L. alba* (BGEN-42 hexaploide) repetição 3.

APÊNDICE C

Análises de *spots* diferencialmente expressos

Tabela 1 - *Spots* diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos aneuploide e diploide (Fold) e massa molecular (kDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Aneuploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|------------|----------|----------|
| 1 | 1,8427 | 0,2212 | 0,1200 | 43,232 | 0,028926 |
| 2 | 1,5283 | 0,4622 | 0,3025 | 15,635 | 0,011221 |
| 4 | 2,1370 | 0,1316 | 0,0616 | 41177 | 0,007374 |
| 7 | 1,7084 | 0,0716 | 0,0419 | 48924 | 0,028862 |
| 11 | 3,6112 | 0,0874 | 0,0242 | 54719 | 0,001838 |
| 13 | 2,3349 | 0,0652 | 0,0279 | 19091 | 0,003186 |
| 14 | 1,6816 | 0,0458 | 0,0272 | 36570 | 0,010776 |
| 23 | 2,4744 | 0,0172 | 0,0070 | 59812 | 0,013684 |
| 28 | 1,7047 | 0,0211 | 0,0124 | 89398 | 0,044350 |
| 33 | 2,1023 | 0,0969 | 0,0461 | 39373 | 0,000034 |
| 36 | 5,8766 | 0,2787 | 0,0474 | 26427 | 0,000005 |
| 38 | 1,5103 | 0,0696 | 0,1052 | 14618 | 0,002744 |
| 40 | 2,3308 | 1,0755 | 2,5066 | 16135 | 0,000032 |
| 43 | 1,8421 | 0,0733 | 0,0398 | 19118 | 0,000016 |
| 46 | 1,5244 | 0,0614 | 0,0403 | 20218 | 0,000959 |
| 48 | 1,5924 | 0,0303 | 0,0483 | 22742 | 0,004978 |
| 52 | 1,7041 | 0,0366 | 0,0215 | 24069 | 0,002247 |
| 61 | 3,5601 | 0,1063 | 0,0299 | 26076 | 0,002665 |
| 63 | 1,5985 | 0,0218 | 0,0349 | 26207 | 0,001203 |
| 69 | 1,6302 | 0,0851 | 0,1387 | 26984 | 0,003928 |
| 76 | 1,8648 | 0,0841 | 0,0451 | 27576 | 0,003381 |
| 85 | 1,5748 | 0,0558 | 0,0879 | 28035 | 0,005731 |
| 89 | 1,6935 | 0,0495 | 0,0838 | 28559 | 0,002639 |
| 92 | 1,6690 | 0,0240 | 0,0144 | 28678 | 0,002558 |
| 93 | 1,5188 | 0,0447 | 0,0679 | 28726 | 0,005596 |
| 95 | 1,6324 | 0,0267 | 0,0435 | 29015 | 0,016794 |
| 105 | 2,4237 | 0,1088 | 0,0449 | 28852 | 0,008894 |
| 113 | 1,8950 | 0,0523 | 0,0276 | 30764 | 0,047251 |
| 114 | 1,6368 | 0,1582 | 0,0967 | 30716 | 0,000396 |
| 117 | 1,7564 | 0,0536 | 0,0942 | 31374 | 0,014321 |
| 125 | 1,6701 | 0,0675 | 0,1128 | 32555 | 0,033225 |
| 133 | 1,8629 | 0,0826 | 0,0443 | 33594 | 0,004478 |
| 150 | 2,0952 | 0,0382 | 0,0182 | 35605 | 0,016941 |
| 151 | 1,5185 | 0,0489 | 0,0322 | 35858 | 0,000637 |
| 152 | 1,5222 | 0,0705 | 0,0463 | 36028 | 0,005958 |
| 154 | 1,5175 | 0,0214 | 0,0324 | 37032 | 0,048068 |
| 162 | 1,5643 | 0,0315 | 0,0202 | 38035 | 0,024420 |
| 164 | 2,1127 | 0,0551 | 0,0261 | 38850 | 0,000236 |

Tabela 1 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos aneuploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA (p<0,05).

| Match ID | Fold | Diploide | Aneuploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|------------|----------|----------|
| 172 | 1,9776 | 0,1520 | 0,0768 | 39652 | 0,000139 |
| 173 | 2,8004 | 0,0710 | 0,0254 | 40534 | 0,001145 |
| 176 | 2,2266 | 0,0421 | 0,0189 | 40694 | 0,003049 |
| 177 | 2,4667 | 0,0571 | 0,0232 | 40376 | 0,002759 |
| 178 | 4,9694 | 0,0435 | 0,0088 | 40407 | 0,000051 |
| 183 | 1,6534 | 0,1696 | 0,1026 | 40983 | 0,002126 |
| 184 | 1,7221 | 0,1981 | 0,1150 | 41177 | 0,003233 |
| 185 | 1,9324 | 0,1388 | 0,0718 | 41080 | 0,000304 |
| 187 | 2,5539 | 0,0780 | 0,0306 | 41177 | 0,000106 |
| 188 | 1,5609 | 0,0662 | 0,1034 | 41501 | 0,014704 |
| 192 | 2,2056 | 0,0617 | 0,0280 | 42370 | 0,009678 |
| 193 | 3,3876 | 0,0791 | 0,0233 | 42026 | 0,000124 |
| 197 | 2,3164 | 0,0690 | 0,0298 | 42325 | 0,001314 |
| 198 | 1,7279 | 3,0655 | 1,7742 | 42525 | 0,000003 |
| 201 | 1,5607 | 1,4123 | 0,9049 | 42325 | 0,000218 |
| 202 | 2,6886 | 0,0389 | 0,0145 | 43063 | 0,000233 |
| 205 | 3,5660 | 0,2241 | 0,0629 | 43471 | 0,000004 |
| 206 | 1,7540 | 0,0436 | 0,0248 | 43402 | 0,000756 |
| 207 | 2,1153 | 0,3983 | 0,1883 | 43300 | 0,000078 |
| 211 | 2,0603 | 0,2864 | 0,1390 | 43642 | 0,000018 |
| 213 | 1,5231 | 0,1647 | 0,1081 | 44021 | 0,000703 |
| 216 | 1,7353 | 0,3752 | 0,2162 | 44125 | 0,003527 |
| 217 | 2,4074 | 0,0920 | 0,0382 | 44125 | 0,000921 |
| 218 | 2,0264 | 0,0601 | 0,1218 | 44543 | 0,001080 |
| 222 | 1,5710 | 0,0537 | 0,0342 | 45182 | 0,010431 |
| 224 | 2,0180 | 0,0593 | 0,0294 | 44929 | 0,000313 |
| 237 | 1,8327 | 0,0676 | 0,1238 | 48727 | 0,000214 |
| 240 | 1,8574 | 0,0858 | 0,1594 | 49056 | 0,027430 |
| 242 | 1,8070 | 0,0202 | 0,0364 | 51013 | 0,007709 |
| 252 | 1,5226 | 1,1300 | 0,7421 | 53551 | 0,001300 |
| 253 | 1,6730 | 0,3635 | 0,6082 | 54351 | 0,003190 |
| 259 | 2,0017 | 0,0835 | 0,0417 | 54719 | 0,021040 |
| 261 | 2,5338 | 0,0186 | 0,0074 | 55312 | 0,048370 |
| 262 | 1,5474 | 0,1130 | 0,1748 | 54940 | 0,019154 |
| 269 | 2,0388 | 0,0508 | 0,0249 | 56519 | 0,013491 |
| 270 | 1,6004 | 0,0217 | 0,0135 | 56978 | 0,006495 |
| 272 | 3,2886 | 0,0142 | 0,0467 | 57209 | 0,001381 |
| 277 | 1,7637 | 0,0162 | 0,0285 | 57751 | 0,018690 |
| 280 | 1,5988 | 0,1236 | 0,0773 | 58535 | 0,008163 |
| 291 | 1,7371 | 0,0445 | 0,0256 | 62957 | 0,001901 |
| 302 | 1,7772 | 0,0319 | 0,0179 | 64504 | 0,021093 |
| 307 | 1,8623 | 0,0166 | 0,0089 | 64678 | 0,032491 |

Tabela 1 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos aneuploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Aneuploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|------------|----------|----------|
| 316 | 1,5352 | 0,0158 | 0,0103 | 67255 | 0,046098 |
| 322 | 1,7250 | 0,0164 | 0,0284 | 69691 | 0,043656 |
| 323 | 2,4506 | 0,0411 | 0,0168 | 70276 | 0,017505 |
| 324 | 4,6352 | 0,0410 | 0,0089 | 71463 | 0,001597 |
| 326 | 1,5081 | 0,0072 | 0,0048 | 77382 | 0,018894 |
| 336 | 2,3662 | 0,0179 | 0,0076 | 76894 | 0,009663 |
| 340 | 1,5248 | 0,2056 | 0,1349 | 76412 | 0,001080 |
| 342 | 1,8480 | 0,0120 | 0,0222 | 78192 | 0,015653 |
| 360 | 2,2106 | 0,0258 | 0,0569 | 85554 | 0,013670 |
| 361 | 1,5595 | 0,0552 | 0,0354 | 84841 | 0,009313 |
| 366 | 1,5044 | 0,0416 | 0,0277 | 89398 | 0,006207 |
| 367 | 2,2253 | 0,0197 | 0,0089 | 89773 | 0,002148 |
| 378 | 2,4701 | 0,0090 | 0,0037 | 95326 | 0,002240 |
| 380 | 1,7917 | 0,0289 | 0,0161 | 98226 | 0,038174 |
| 382 | 1,8236 | 0,0253 | 0,0139 | 81193 | 0,025049 |
| 383 | 2,7873 | 0,0125 | 0,0348 | 100093 | 0,046859 |
| 384 | 2,1894 | 0,0158 | 0,0346 | 100093 | 0,010730 |
| 385 | 2,1360 | 0,0117 | 0,0250 | 100093 | 0,013383 |
| 401 | 2,4996 | 0,0342 | 0,0137 | 16855 | 0,000285 |
| 405 | 1,6777 | 0,0270 | 0,0161 | 36787 | 0,020084 |
| 408 | 1,8036 | 0,0491 | 0,0272 | 18236 | 0,024743 |
| 418 | 1,6465 | 0,0382 | 0,0629 | 37589 | 0,001268 |
| 419 | 2,5341 | 0,0331 | 0,0840 | 51706 | 0,016927 |
| 424 | 1,8830 | 0,0530 | 0,0282 | 48595 | 0,005323 |
| 430 | 2,4144 | 0,0944 | 0,0391 | 45061 | 0,000255 |
| 432 | 1,6071 | 0,0454 | 0,0729 | 43229 | 0,000083 |
| 434 | 1,9721 | 0,0211 | 0,0415 | 57985 | 0,004313 |
| 435 | 2,0924 | 0,0674 | 0,0322 | 85197 | 0,023686 |
| 436 | 2,0064 | 0,0498 | 0,0999 | 41829 | 0,004301 |
| 437 | 1,7535 | 0,1459 | 0,0832 | 32224 | 0,001158 |
| 438 | 2,0545 | 0,0510 | 0,1047 | 36113 | 0,041832 |
| 447 | 1,5429 | 0,0530 | 0,0817 | 24413 | 0,022617 |
| 448 | 2,0545 | 0,0534 | 0,1098 | 42793 | 0,000084 |
| 452 | 1,7035 | 0,0542 | 0,0924 | 50126 | 0,009104 |
| 459 | 1,6847 | 0,0415 | 0,0699 | 42726 | 0,014711 |
| 465 | 1,8094 | 0,0911 | 0,1649 | 40534 | 0,014737 |
| 466 | 1,8672 | 0,0641 | 0,1197 | 31523 | 0,014175 |
| 468 | 2,8387 | 0,0815 | 0,0287 | 70571 | 0,004471 |
| 469 | 1,6519 | 0,0939 | 0,0568 | 29479 | 0,015524 |
| 471 | 1,6334 | 0,0953 | 0,0583 | 54866 | 0,019718 |
| 475 | 1,7918 | 0,1096 | 0,1963 | 26449 | 0,019468 |
| 487 | 1,5934 | 0,1378 | 0,0865 | 43539 | 0,014821 |

Tabela 1 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos aneuploide e diploide (Fold) e Massa molecular (KDa), ANOVA (p<0,05).

| Match ID | Fold | Diploide | Aneuploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|------------|----------|----------|
| 497 | 1,9652 | 0,4172 | 0,2123 | 29925 | 0,008971 |
| 498 | 1,5107 | 0,1293 | 0,1954 | 57985 | 0,030243 |
| 504 | 1,9342 | 0,2885 | 0,1492 | 39342 | 0,010805 |
| 512 | 1,6851 | 0,5812 | 0,3449 | 42928 | 0,011978 |
| 515 | | | 0,0919 | 14430 | 0,003229 |
| 517 | | | 0,0457 | 16018 | 0,065253 |
| 519 | | | 0,0431 | 16257 | 0,058672 |
| 520 | | | 0,0292 | 16360 | 0,001261 |
| 521 | | | 0,0577 | 16337 | 0,006162 |
| 522 | | | 0,0276 | 17091 | 0,009414 |
| 523 | | | 0,1912 | 17055 | 0,002090 |
| 524 | | | 0,0264 | 17383 | 0,000325 |
| 525 | | | 0,0356 | 17493 | 0,000035 |
| 526 | | | 0,2205 | 17642 | 0,001798 |
| 527 | | | 0,1255 | 18327 | 0,005859 |
| 528 | | | 0,0364 | 18495 | 0,020887 |
| 529 | | | 0,0434 | 18891 | 0,000005 |
| 530 | | | 0,0262 | 19308 | 0,000006 |
| 531 | | | 0,0223 | 19404 | 0,000048 |
| 532 | | | 0,0194 | 20173 | 0,000143 |
| 533 | | | 0,0239 | 20173 | 0,000028 |
| 534 | | | 0,0187 | 22176 | 0,000090 |
| 536 | | | 0,0278 | 23251 | 0,000003 |
| 540 | | | 0,0531 | 25076 | 0,000033 |
| 544 | | | 0,0124 | 26507 | 0,000155 |
| 545 | | | 0,0257 | 26483 | 0,002300 |
| 547 | | | 0,0566 | 26970 | 0,000351 |
| 549 | | | 0,0272 | 28431 | 0,000017 |
| 550 | | | 0,0302 | 28483 | 0,026510 |
| 552 | | | 0,0418 | 28457 | 0,000081 |
| 555 | | | 0,0615 | 29086 | 0,000257 |
| 558 | | | 0,1474 | 30361 | 0,000025 |
| 560 | | | 0,0148 | 30833 | 0,000021 |
| 561 | | | 0,0621 | 30727 | 0,000118 |
| 564 | | | 0,0281 | 31097 | 0,000907 |
| 568 | | | 0,0211 | 32070 | 0,000287 |
| 570 | | | 0,0164 | 32679 | 0,000016 |
| 572 | | | 0,0198 | 34224 | 0,000069 |
| 574 | | | 0,0194 | 34489 | 0,000672 |
| 575 | | | 0,0239 | 34577 | 0,000108 |
| 577 | | | 0,0160 | 36274 | 0,000939 |
| 578 | | | 0,0508 | 36429 | 0,000142 |

Tabela 1 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos aneuploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Aneuploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|------|----------|------------|----------|----------|
| 579 | | | 0,0161 | 36648 | 0,000087 |
| 580 | | | 0,0289 | 36586 | 0,000482 |
| 583 | | | 0,0139 | 37281 | 0,003837 |
| 584 | | | 0,0225 | 38348 | 0,001152 |
| 585 | | | 0,0561 | 38348 | 0,000236 |
| 587 | | | 0,0547 | 39010 | 0,000573 |
| 589 | | | 0,0667 | 39177 | 0,004982 |
| 590 | | | 0,0118 | 39547 | 0,003253 |
| 591 | | | 0,0411 | 39581 | 0,001065 |
| 594 | | | 0,0142 | 40679 | 0,000102 |
| 596 | | | 0,0268 | 40924 | 0,000007 |
| 597 | | | 0,0305 | 41594 | 0,002501 |
| 598 | | | 0,0468 | 41844 | 0,000187 |
| 599 | | | 0,0183 | 41952 | 0,000005 |
| 600 | | | 0,0734 | 41988 | 0,000056 |
| 601 | | | 0,1833 | 41773 | 0,000217 |
| 602 | | | 0,0597 | 42168 | 0,000001 |
| 603 | | | 0,2547 | 42566 | 0,000032 |
| 604 | | | 0,1030 | 43190 | 0,017105 |
| 613 | | | 0,0160 | 49099 | 0,000389 |
| 620 | | | 0,0102 | 52811 | 0,000158 |
| 621 | | | 0,0344 | 55046 | 0,000017 |
| 622 | | | 0,0061 | 55520 | 0,000284 |
| 623 | | | 0,0068 | 55599 | 0,016430 |
| 624 | | | 0,0205 | 55599 | 0,000831 |
| 625 | | | 0,0216 | 55758 | 0,002168 |
| 627 | | | 0,0498 | 56078 | 0,000014 |
| 628 | | | 0,0125 | 56885 | 0,006772 |
| 630 | | | 0,0046 | 57786 | 0,000313 |
| 631 | | | 0,0099 | 57704 | 0,000012 |
| 632 | | | 0,0173 | 57952 | 0,002298 |
| 634 | | | 0,0077 | 58367 | 0,001579 |
| 635 | | | 0,0090 | 58284 | 0,000077 |
| 636 | | | 0,0276 | 59207 | 0,012910 |
| 637 | | | 0,0117 | 60318 | 0,000000 |
| 640 | | | 0,0136 | 62422 | 0,000932 |
| 641 | | | 0,0094 | 62422 | 0,004750 |
| 642 | | | 0,0433 | 62155 | 0,000002 |
| 643 | | | 0,0165 | 62601 | 0,000225 |
| 646 | | | 0,0097 | 63411 | 0,010588 |
| 647 | | | 0,0216 | 64600 | 0,000777 |
| 648 | | | 0,0102 | 64971 | 0,000570 |

Tabela 1 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos aneuploide e diploide (Fold) em Massa molecular (kDa), ANOVA (p<0,05).

| Match ID | Fold | Diploide | Aneuploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|------|----------|------------|----------|----------|
| 649 | | | 0,0094 | 65437 | 0,004999 |
| 650 | | | 0,0206 | 65250 | 0,000852 |
| 651 | | | 0,0069 | 65343 | 0,000019 |
| 654 | | | 0,0103 | 65906 | 0,002350 |
| 656 | | | 0,0055 | 66998 | 0,000006 |
| 663 | | | 0,0287 | 82656 | 0,000115 |
| 666 | | | 0,0653 | 18587 | 0,015667 |
| 668 | | | 0,0110 | 31311 | 0,000105 |
| 671 | | | 0,0517 | 16698 | 0,007768 |
| 674 | | 0,1203 | | 29800 | 0,000003 |
| 689 | | 0,0810 | | 29504 | 0,000001 |
| 690 | | 0,0625 | | 29701 | 0,000063 |
| 691 | | 0,0280 | | 30380 | 0,000101 |
| 698 | | 0,0202 | | 45122 | 0,000001 |
| 703 | | 0,0283 | | 62450 | 0,002131 |
| 707 | | 0,0190 | | 62788 | 0,000037 |
| 708 | | 0,0135 | | 64417 | 0,001894 |
| 710 | | 0,0312 | | 101358 | 0,049269 |
| 712 | | 0,0517 | | 31888 | 0,000024 |
| 714 | | 0,0553 | | 121853 | 0,000204 |
| 715 | | 0,0691 | | 32503 | 0,000726 |

Tabela 2 - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos triploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Triploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|-----------|----------|----------|
| 6 | 2,0198 | 0,0609 | 0,1230 | 31591 | 0,028289 |
| 7 | 1,7063 | 0,0624 | 0,1064 | 24969 | 0,000057 |
| 10 | 1,9198 | 0,0075 | 0,0144 | 60634 | 0,036630 |
| 18 | 1,7430 | 0,1198 | 0,2089 | 23631 | 0,029776 |
| 25 | 1,5466 | 0,6034 | 0,3901 | 59646 | 0,019128 |
| 26 | 1,9023 | 0,0583 | 0,1109 | 17888 | 0,021205 |
| 31 | 1,7691 | 0,0753 | 0,1331 | 35890 | 0,001864 |
| 36 | 1,6085 | 0,0248 | 0,0398 | 27923 | 0,006860 |
| 38 | 1,7541 | 0,0334 | 0,0586 | 22365 | 0,047150 |
| 39 | 2,1155 | 0,0436 | 0,0923 | 26961 | 0,035038 |
| 40 | 2,1628 | 0,0478 | 0,1034 | 31690 | 0,035619 |
| 42 | 2,3969 | 0,0291 | 0,0696 | 27097 | 0,003866 |
| 47 | 1,6216 | 0,0575 | 0,0932 | 23710 | 0,000384 |
| 48 | 1,5670 | 0,0130 | 0,0203 | 23299 | 0,015480 |
| 49 | 1,5906 | 0,0429 | 0,0683 | 22704 | 0,013977 |
| 50 | 1,6452 | 0,0505 | 0,0830 | 22780 | 0,002348 |
| 55 | 1,5019 | 0,0435 | 0,0653 | 19835 | 0,000150 |
| 62 | 2,7883 | 13,9705 | 5,0105 | 52164 | 0,001334 |
| 63 | 2,6982 | 19,6857 | 7,2958 | 52307 | 0,000477 |
| 64 | 1,9455 | 0,5707 | 1,1103 | 13675 | 0,034345 |
| 65 | 2,7515 | 0,0756 | 0,2081 | 14539 | 0,000059 |
| 67 | 1,5340 | 0,0338 | 0,0518 | 16121 | 0,021584 |
| 68 | 2,4926 | 1,0681 | 2,6623 | 16085 | 0,000005 |
| 69 | 1,5692 | 0,0313 | 0,0491 | 16801 | 0,003334 |
| 72 | 2,9361 | 0,0746 | 0,2189 | 17691 | 0,007698 |
| 74 | 2,2167 | 0,0509 | 0,1128 | 18948 | 0,011239 |
| 78 | 1,8403 | 0,0856 | 0,0465 | 19864 | 0,003768 |
| 79 | 1,5736 | 0,1277 | 0,2009 | 20336 | 0,001955 |
| 86 | 3,2762 | 0,0437 | 0,1432 | 24990 | 0,011662 |
| 91 | 2,0882 | 0,0330 | 0,0688 | 25242 | 0,006507 |
| 98 | 6,0957 | 0,0832 | 0,0137 | 26427 | 0,033809 |
| 100 | 1,8954 | 0,1019 | 0,1931 | 26693 | 0,001885 |
| 101 | 1,8210 | 0,1838 | 0,3347 | 26916 | 0,000442 |
| 102 | 1,5639 | 0,1015 | 0,1588 | 27119 | 0,000676 |
| 104 | 2,2762 | 0,0656 | 0,0288 | 27187 | 0,002043 |
| 105 | 1,5897 | 0,3714 | 0,5904 | 26961 | 0,010129 |
| 107 | 1,7677 | 0,0360 | 0,0637 | 27484 | 0,000960 |
| 109 | 1,7127 | 0,3281 | 0,1916 | 27691 | 0,004866 |
| 126 | 1,9522 | 0,0554 | 0,1082 | 28702 | 0,002308 |
| 129 | 1,7789 | 0,0500 | 0,0889 | 28870 | 0,018230 |
| 130 | 2,2077 | 0,0485 | 0,1070 | 29064 | 0,000108 |
| 131 | 1,7954 | 0,0305 | 0,0547 | 29161 | 0,025604 |

Tabela 2 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos triploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Triploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|-----------|----------|----------|
| 132 | 1,5445 | 0,2509 | 0,3874 | 29064 | 0,003347 |
| 133 | 1,6124 | 0,2458 | 0,3964 | 29210 | 0,003990 |
| 143 | 1,5371 | 0,1887 | 0,2900 | 30047 | 0,028171 |
| 145 | 2,0441 | 0,1356 | 0,2771 | 29975 | 0,003661 |
| 155 | 1,5870 | 0,0351 | 0,0556 | 31076 | 0,006431 |
| 156 | 1,7867 | 0,1754 | 0,3133 | 30906 | 0,016873 |
| 157 | 2,1162 | 0,1103 | 0,2333 | 31492 | 0,031962 |
| 158 | 2,7322 | 0,0640 | 0,1747 | 31566 | 0,005906 |
| 159 | 1,8009 | 0,0656 | 0,1182 | 31889 | 0,001549 |
| 161 | 1,9029 | 0,0684 | 0,1302 | 32039 | 0,002891 |
| 163 | 1,6918 | 0,2216 | 0,1310 | 32493 | 0,036451 |
| 172 | 2,5565 | 0,0747 | 0,1909 | 32698 | 0,001118 |
| 178 | 2,4346 | 0,0341 | 0,0829 | 33738 | 0,044851 |
| 179 | 3,1322 | 0,0601 | 0,1884 | 33711 | 0,000132 |
| 180 | 1,8459 | 0,0572 | 0,1056 | 33764 | 0,008042 |
| 186 | 2,7092 | 0,1408 | 0,3815 | 34056 | 0,001687 |
| 187 | 1,7147 | 0,0697 | 0,1195 | 34811 | 0,001356 |
| 192 | 1,6192 | 0,4371 | 0,7078 | 34783 | 0,004196 |
| 193 | 1,5314 | 1,0157 | 1,5555 | 34947 | 0,000083 |
| 195 | 2,2713 | 0,2563 | 0,5822 | 35139 | 0,002457 |
| 196 | 1,9081 | 0,1246 | 0,2378 | 35222 | 0,021668 |
| 214 | 2,5100 | 0,0315 | 0,0790 | 36858 | 0,004075 |
| 223 | 1,5957 | 0,0398 | 0,0250 | 38539 | 0,019418 |
| 229 | 1,6081 | 0,1983 | 0,3188 | 38964 | 0,009054 |
| 230 | 1,7549 | 0,3084 | 0,5412 | 38994 | 0,000556 |
| 232 | 1,7959 | 0,1664 | 0,2988 | 39239 | 0,005610 |
| 234 | 1,5333 | 0,2341 | 0,3589 | 39579 | 0,001014 |
| 238 | 2,6177 | 0,0835 | 0,0319 | 40583 | 0,014549 |
| 244 | 3,4394 | 0,0638 | 0,0186 | 40519 | 0,001079 |
| 245 | 1,5795 | 0,1500 | 0,0949 | 40519 | 0,031906 |
| 246 | 1,6644 | 0,0680 | 0,1132 | 40742 | 0,009497 |
| 248 | 1,5052 | 0,0401 | 0,0604 | 41094 | 0,006689 |
| 254 | 2,0339 | 0,0233 | 0,0473 | 41417 | 0,024245 |
| 257 | 1,5680 | 0,2152 | 0,1372 | 41677 | 0,025567 |
| 260 | 1,8608 | 0,1360 | 0,0731 | 42136 | 0,010813 |
| 270 | 1,8720 | 0,0677 | 0,1268 | 43036 | 0,027021 |
| 275 | 1,5599 | 0,2141 | 0,1373 | 43511 | 0,027146 |
| 281 | 2,2766 | 0,2449 | 0,5575 | 43647 | 0,002719 |
| 282 | 1,7217 | 0,2089 | 0,3597 | 43921 | 0,008540 |
| 283 | 1,5918 | 0,0710 | 0,0446 | 43990 | 0,031703 |
| 286 | 2,5333 | 0,1976 | 0,0780 | 43852 | 0,000473 |
| 300 | 3,3562 | 0,0712 | 0,0212 | 45000 | 0,000394 |

Tabela 2 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos triploide e diploide (Fold) e massa molecular (kDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Triploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|-----------|----------|----------|
| 308 | 2,1231 | 0,2710 | 0,5754 | 46821 | 0,000381 |
| 317 | 1,8676 | 0,0183 | 0,0343 | 48782 | 0,018728 |
| 321 | 1,6393 | 0,0625 | 0,0381 | 48983 | 0,011204 |
| 322 | 2,7449 | 0,0331 | 0,0909 | 48916 | 0,002397 |
| 323 | 2,8357 | 0,0750 | 0,2126 | 49050 | 0,012605 |
| 325 | 1,9805 | 0,0199 | 0,0395 | 50204 | 0,008902 |
| 336 | 2,3370 | 0,0118 | 0,0276 | 51455 | 0,000566 |
| 338 | 1,5917 | 3,1101 | 4,9503 | 52378 | 0,000103 |
| 339 | 1,5675 | 0,1612 | 0,1029 | 51879 | 0,023709 |
| 347 | 1,8421 | 0,3453 | 0,6360 | 54797 | 0,002741 |
| 353 | 1,7865 | 0,1009 | 0,0565 | 55097 | 0,023730 |
| 356 | 2,5850 | 0,1217 | 0,3147 | 55627 | 0,001885 |
| 357 | 3,0414 | 0,0573 | 0,1741 | 55780 | 0,012489 |
| 359 | 2,2247 | 0,1233 | 0,0554 | 55551 | 0,008969 |
| 361 | 1,8349 | 0,0656 | 0,0357 | 56548 | 0,034429 |
| 372 | 1,5251 | 0,0369 | 0,0563 | 57720 | 0,009220 |
| 378 | 2,0346 | 0,1368 | 0,0672 | 59078 | 0,002717 |
| 380 | 2,1445 | 0,1456 | 0,3122 | 58515 | 0,012650 |
| 393 | 1,7481 | 0,0090 | 0,0158 | 63260 | 0,002921 |
| 395 | 1,5279 | 0,0138 | 0,0090 | 63520 | 0,000136 |
| 396 | 1,5817 | 0,0497 | 0,0314 | 63607 | 0,037236 |
| 397 | 1,7398 | 0,0898 | 0,0516 | 63607 | 0,044639 |
| 404 | 1,5774 | 0,1002 | 0,0635 | 64571 | 0,032492 |
| 413 | 1,8094 | 0,0140 | 0,0254 | 68187 | 0,002061 |
| 416 | 8,3756 | 0,0121 | 0,1009 | 68326 | 0,047192 |
| 421 | 2,0626 | 0,0530 | 0,0257 | 71313 | 0,028649 |
| 422 | 1,7847 | 0,0733 | 0,0411 | 71604 | 0,002303 |
| 424 | 2,9047 | 0,0457 | 0,0157 | 72484 | 0,002906 |
| 425 | 2,0152 | 0,0331 | 0,0164 | 72632 | 0,008050 |
| 426 | 1,5505 | 0,1578 | 0,1018 | 75345 | 0,026228 |
| 435 | 1,9301 | 0,0763 | 0,0395 | 78001 | 0,004692 |
| 438 | 2,2281 | 0,2287 | 0,1026 | 77368 | 0,000611 |
| 441 | 1,9276 | 0,0341 | 0,0657 | 79282 | 0,006123 |
| 444 | 2,5385 | 0,0184 | 0,0072 | 81743 | 0,021200 |
| 451 | 2,3729 | 0,0535 | 0,0225 | 85142 | 0,010157 |
| 452 | 2,6884 | 0,1107 | 0,0412 | 84969 | 0,002925 |
| 453 | 1,5006 | 0,1294 | 0,0863 | 84969 | 0,021595 |
| 457 | 1,5541 | 0,0604 | 0,0389 | 86014 | 0,012740 |
| 462 | 2,4187 | 0,0567 | 0,0235 | 89591 | 0,035022 |
| 463 | 2,2706 | 0,0467 | 0,0205 | 90140 | 0,007631 |
| 471 | 2,1452 | 0,0105 | 0,0049 | 92937 | 0,000174 |
| 474 | 1,5286 | 0,0210 | 0,0320 | 100623 | 0,043121 |

Tabela 2 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos triploide e diploide (Fold) e massa molecular (kDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Triploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|-----------|----------|----------|
| 475 | 1,5024 | 0,0525 | 0,0350 | 100828 | 0,031861 |
| 476 | 2,5334 | 0,1120 | 0,2838 | 24638 | 0,003297 |
| 478 | | | 0,0210 | 43138 | 0,000031 |
| 482 | | | 0,0380 | 17934 | 0,000327 |
| 484 | | | 0,0707 | 15854 | 0,001193 |
| 485 | | | 0,0458 | 15991 | 0,000001 |
| 486 | | | 0,0690 | 16321 | 0,000003 |
| 487 | | | 0,0327 | 16890 | 0,000189 |
| 488 | | | 0,0469 | 17193 | 0,002018 |
| 490 | | | 0,0628 | 17261 | 0,000102 |
| 491 | | | 0,0544 | 17284 | 0,009672 |
| 492 | | | 0,0518 | 17746 | 0,000038 |
| 493 | | | 0,0253 | 17758 | 0,000000 |
| 494 | | | 0,0389 | 17946 | 0,000560 |
| 496 | | | 0,0910 | 19295 | 0,000070 |
| 498 | | | 0,0528 | 19655 | 0,002246 |
| 499 | | | 0,0912 | 19577 | 0,002270 |
| 500 | | | 0,0426 | 19994 | 0,001776 |
| 501 | | | 0,0287 | 20648 | 0,000077 |
| 502 | | | 0,1352 | 22881 | 0,002386 |
| 503 | | | 0,0268 | 23074 | 0,000122 |
| 509 | | | 0,0579 | 25311 | 0,015488 |
| 513 | | | 0,0486 | 26002 | 0,000322 |
| 518 | | | 0,0466 | 26689 | 0,045464 |
| 523 | | | 0,0248 | 27256 | 0,000043 |
| 534 | | | 0,0375 | 28885 | 0,000077 |
| 535 | | | 0,0315 | 29007 | 0,002068 |
| 536 | | | 0,1453 | 29129 | 0,002556 |
| 544 | | | 0,1862 | 29499 | 0,001139 |
| 549 | | | 0,0103 | 31295 | 0,002007 |
| 552 | | | 0,0851 | 31756 | 0,000010 |
| 555 | | | 0,0704 | 32487 | 0,017136 |
| 563 | | | 0,0125 | 34528 | 0,002727 |
| 565 | | | 0,0461 | 35179 | 0,075515 |
| 567 | | | 0,0134 | 35409 | 0,000049 |
| 576 | | | 0,0387 | 36877 | 0,009278 |
| 581 | | | 0,0529 | 36877 | 0,000010 |
| 582 | | | 0,0257 | 36937 | 0,000291 |
| 585 | | | 0,0238 | 37695 | 0,000031 |
| 597 | | | 0,0867 | 39610 | 0,000748 |
| 599 | | | 0,0962 | 39643 | 0,002469 |
| 602 | | | 0,1047 | 40129 | 0,006602 |

Tabela 2 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos triploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Triploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|------|----------|-----------|----------|----------|
| 611 | | | 0,1003 | 42340 | 0,000012 |
| 612 | | | 0,0715 | 42408 | 0,012930 |
| 641 | | | 0,0218 | 50472 | 0,000042 |
| 651 | | | 0,0101 | 58064 | 0,000892 |
| 658 | | | 0,0332 | 62988 | 0,006973 |
| 662 | | | 0,0104 | 64692 | 0,000102 |
| 675 | | 0,0198 | | 68465 | 0,000281 |
| 676 | | 0,0476 | | 104169 | 0,012813 |
| 682 | | 0,0281 | | 63001 | 0,001771 |
| 683 | | 0,0331 | | 16727 | 0,000951 |
| 689 | | 0,0953 | | 29627 | 0,000031 |
| 690 | | 0,0858 | | 29950 | 0,003221 |
| 701 | | 0,0259 | | 34729 | 0,004328 |
| 709 | | 0,1093 | | 40742 | 0,000147 |
| 713 | | 0,0206 | | 45371 | 0,003389 |
| 725 | | 0,0486 | | 55173 | 0,002064 |
| 730 | | 0,0175 | | 63433 | 0,000413 |
| 731 | | 0,0179 | | 63433 | 0,001821 |
| 735 | | 0,0150 | | 65103 | 0,002500 |
| 740 | | 0,0157 | | 65820 | 0,000458 |
| 745 | | 0,0175 | | 68326 | 0,000593 |
| 748 | | 0,0442 | | 72190 | 0,000034 |
| 753 | | 0,0092 | | 78319 | 0,004958 |
| 755 | | 0,0121 | | 80257 | 0,001133 |
| 760 | | 0,0262 | | 87072 | 0,000000 |
| 761 | | 0,0096 | | 87072 | 0,000118 |
| 765 | | 0,0546 | | 89957 | 0,053970 |
| 767 | | 0,0061 | | 96017 | 0,000572 |
| 770 | | 0,0235 | | 100828 | 0,003889 |
| 772 | | 0,0603 | | 101240 | 0,000609 |
| 773 | | 0,0358 | | 107677 | 0,056507 |
| 779 | | 0,0603 | | 121862 | 0,002066 |

Tabela 3 - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos tetraploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Tetraploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|-------------|----------|----------|
| 4 | 1,5291 | 0,4660 | 0,3047 | 23,8281 | 0,016651 |
| 6 | 2,1661 | 0,1750 | 0,0808 | 11,7563 | 0,027356 |
| 12 | 1,9721 | 0,1173 | 0,2314 | 15,7707 | 0,003275 |
| 13 | 2,1861 | 0,0319 | 0,0697 | 6,7384 | 0,000843 |
| 24 | 1,6342 | 0,0881 | 0,0539 | 54719 | 0,021366 |
| 33 | 1,6896 | 0,0658 | 0,0389 | 19091 | 0,011652 |
| 39 | 1,6552 | 0,0354 | 0,0586 | 36598 | 0,042117 |
| 47 | 1,8282 | 0,0516 | 0,0282 | 17798 | 0,012971 |
| 51 | 1,5811 | 0,0147 | 0,0233 | 45549 | 0,014851 |
| 52 | 2,6231 | 0,0547 | 0,0209 | 50126 | 0,007027 |
| 57 | 1,7441 | 0,0118 | 0,0206 | 100093 | 0,008146 |
| 63 | 2,0426 | 0,1304 | 0,0639 | 16240 | 0,009944 |
| 83 | 2,1845 | 0,2810 | 0,1286 | 26427 | 0,000436 |
| 85 | 1,8241 | 0,0702 | 0,1281 | 14618 | 0,000393 |
| 94 | 2,0851 | 0,0739 | 0,0354 | 19118 | 0,001050 |
| 95 | 1,7843 | 0,0597 | 0,1065 | 19786 | 0,001280 |
| 98 | 1,5256 | 0,0440 | 0,0671 | 20661 | 0,006641 |
| 99 | 1,5748 | 0,0306 | 0,0482 | 22742 | 0,013655 |
| 101 | 2,4887 | 0,0520 | 0,1295 | 23279 | 0,004078 |
| 103 | 1,6019 | 0,0369 | 0,0231 | 24069 | 0,000640 |
| 106 | 1,6656 | 0,1326 | 0,2209 | 24886 | 0,011057 |
| 107 | 1,5925 | 0,0574 | 0,0360 | 24865 | 0,014104 |
| 108 | 1,9922 | 0,0520 | 0,0261 | 24928 | 0,038627 |
| 117 | 1,7583 | 0,1316 | 0,0749 | 26076 | 0,000565 |
| 120 | 1,9258 | 0,0783 | 0,1507 | 26449 | 0,017739 |
| 126 | 1,8183 | 0,3398 | 0,6178 | 26894 | 0,000822 |
| 127 | 2,0916 | 0,0311 | 0,0650 | 27415 | 0,026007 |
| 141 | 1,9567 | 0,0563 | 0,1102 | 28110 | 0,001920 |
| 142 | 2,0661 | 0,0756 | 0,1562 | 28393 | 0,001419 |
| 144 | 2,0302 | 0,0782 | 0,1588 | 28559 | 0,000045 |
| 151 | 2,0455 | 0,0451 | 0,0923 | 28726 | 0,000027 |
| 153 | 2,3861 | 0,0269 | 0,0642 | 29015 | 0,007527 |
| 154 | 1,5070 | 0,2276 | 0,3431 | 28919 | 0,015192 |
| 155 | 1,7509 | 0,0697 | 0,0398 | 29088 | 0,003171 |
| 161 | 2,2383 | 0,1429 | 0,0639 | 29479 | 0,001593 |
| 164 | 2,2740 | 0,1197 | 0,0527 | 29800 | 0,000240 |
| 167 | 2,5990 | 0,1098 | 0,0422 | 29652 | 0,011036 |
| 168 | 1,5287 | 0,0630 | 0,0412 | 29701 | 0,006082 |
| 172 | 1,5149 | 0,0282 | 0,0186 | 30380 | 0,012458 |
| 173 | 1,6543 | 0,0300 | 0,0497 | 30499 | 0,014273 |
| 236 | 1,8281 | 0,0428 | 0,0783 | 37826 | 0,029775 |
| 238 | 1,6116 | 0,0331 | 0,0205 | 37975 | 0,002912 |

Tabela 3 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos tetraploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Tetraploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|-------------|----------|----------|
| 241 | 1,7374 | 0,0278 | 0,0483 | 38275 | 0,021610 |
| 253 | 2,5127 | 0,0361 | 0,0907 | 39808 | 0,013669 |
| 255 | 1,7145 | 0,0421 | 0,0245 | 40028 | 0,004369 |
| 260 | 1,8771 | 0,0439 | 0,0824 | 40407 | 0,017734 |
| 265 | 1,8939 | 0,0365 | 0,0691 | 40951 | 0,046310 |
| 266 | 1,7323 | 0,0847 | 0,1467 | 40854 | 0,021839 |
| 269 | 1,6915 | 0,2224 | 0,1315 | 41080 | 0,000093 |
| 272 | 1,8268 | 0,0220 | 0,0121 | 41241 | 0,013964 |
| 275 | 3,4883 | 0,0668 | 0,2330 | 41501 | 0,000052 |
| 289 | 1,5207 | 0,0615 | 0,0404 | 42592 | 0,001032 |
| 290 | 1,6507 | 0,0457 | 0,0277 | 42692 | 0,041958 |
| 300 | 1,5064 | 0,0439 | 0,0292 | 43402 | 0,021117 |
| 308 | 1,5052 | 0,1661 | 0,2500 | 44021 | 0,005368 |
| 311 | 2,1304 | 0,3783 | 0,1776 | 44125 | 0,000013 |
| 316 | 1,7401 | 0,0204 | 0,0117 | 45122 | 0,008630 |
| 318 | 1,9507 | 0,0542 | 0,0278 | 45182 | 0,000249 |
| 323 | 1,6543 | 0,0221 | 0,0365 | 45304 | 0,031697 |
| 328 | 1,5589 | 0,1571 | 0,1008 | 45673 | 0,016246 |
| 329 | 1,5600 | 0,0152 | 0,0237 | 45982 | 0,011420 |
| 333 | 2,1436 | 0,0603 | 0,1293 | 47945 | 0,011827 |
| 340 | 1,8711 | 0,0534 | 0,0286 | 48595 | 0,000335 |
| 341 | 1,9335 | 0,0226 | 0,0436 | 48727 | 0,002622 |
| 342 | 1,8570 | 0,0300 | 0,0557 | 48595 | 0,005804 |
| 343 | 1,6898 | 0,0681 | 0,1151 | 48727 | 0,003869 |
| 346 | 1,6363 | 0,0866 | 0,0529 | 49056 | 0,043431 |
| 347 | 2,1937 | 0,0926 | 0,0422 | 49991 | 0,000115 |
| 351 | 2,0034 | 0,0203 | 0,0407 | 51013 | 0,024204 |
| 355 | 4,2313 | 1,0929 | 4,6242 | 51706 | 0,000003 |
| 356 | 1,8791 | 0,0621 | 0,0331 | 51706 | 0,010280 |
| 359 | 2,0675 | 0,1457 | 0,0704 | 51497 | 0,000292 |
| 361 | 3,4856 | 0,0197 | 0,0685 | 52266 | 0,039567 |
| 363 | 1,9088 | 2,5771 | 1,3501 | 53119 | 0,000020 |
| 367 | 1,5519 | 1,1394 | 0,7342 | 53551 | 0,000095 |
| 375 | 2,6738 | 1,0324 | 0,3861 | 54571 | 0,000051 |
| 376 | 4,5396 | 0,1831 | 0,0403 | 54792 | 0,006739 |
| 378 | 2,2518 | 0,0929 | 0,2093 | 54498 | 0,000573 |
| 386 | 1,9556 | 0,0771 | 0,1507 | 55089 | 0,017741 |
| 388 | 7,8385 | 0,0673 | 0,5276 | 55873 | 0,015579 |
| 397 | 2,1019 | 0,0194 | 0,0408 | 57674 | 0,012637 |
| 402 | 1,6963 | 0,0232 | 0,0393 | 58142 | 0,015864 |
| 408 | 3,6232 | 0,0223 | 0,0808 | 58931 | 0,031538 |
| 411 | 1,8962 | 0,0716 | 0,0378 | 58614 | 0,002293 |

Tabela 3 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos tetraploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Tetraploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|-------------|----------|----------|
| 414 | 1,8412 | 0,1510 | 0,0820 | 58614 | 0,023541 |
| 415 | 2,9722 | 0,0438 | 0,1300 | 59490 | 0,000068 |
| 416 | 2,2482 | 0,0417 | 0,0938 | 59893 | 0,032358 |
| 426 | 2,0371 | 0,0191 | 0,0390 | 62788 | 0,000633 |
| 433 | 1,7973 | 0,0354 | 0,0635 | 63640 | 0,015996 |
| 434 | 1,5249 | 0,0146 | 0,0222 | 63812 | 0,044778 |
| 437 | 2,3828 | 0,0060 | 0,0143 | 64244 | 0,044204 |
| 443 | 2,1015 | 0,0467 | 0,0981 | 64591 | 0,000722 |
| 458 | 2,5427 | 0,0166 | 0,0422 | 69691 | 0,020948 |
| 462 | 2,4104 | 0,0208 | 0,0502 | 71016 | 0,003657 |
| 470 | 2,1760 | 0,0295 | 0,0136 | 75459 | 0,022730 |
| 486 | 1,6413 | 0,0110 | 0,0181 | 79346 | 0,028370 |
| 487 | 1,5512 | 0,0552 | 0,0857 | 78684 | 0,014062 |
| 488 | 5,2237 | 0,0048 | 0,0248 | 79512 | 0,000040 |
| 497 | 1,5474 | 0,1003 | 0,0648 | 84134 | 0,001501 |
| 507 | 1,5735 | 0,0096 | 0,0151 | 86273 | 0,025710 |
| 511 | 1,6260 | 0,0199 | 0,0122 | 89773 | 0,007093 |
| 513 | 1,6240 | 0,0103 | 0,0167 | 90338 | 0,028907 |
| 516 | 1,5729 | 0,0062 | 0,0097 | 92249 | 0,034725 |
| 517 | 1,6143 | 0,0110 | 0,0177 | 92056 | 0,020206 |
| 518 | 1,6064 | 0,0122 | 0,0195 | 92056 | 0,035186 |
| 522 | 3,2658 | 0,0160 | 0,0521 | 100093 | 0,000546 |
| 523 | 1,7972 | 0,0210 | 0,0378 | 100303 | 0,017193 |
| 524 | 1,6697 | 0,0171 | 0,0286 | 100303 | 0,002566 |
| 529 | 2,6693 | 0,0063 | 0,0169 | 101570 | 0,014770 |
| 534 | | | 0,0356 | 17428 | 0,001292 |
| 535 | | | 0,0782 | 19482 | 0,007730 |
| 537 | | | 0,0233 | 23063 | 0,000010 |
| 538 | | | 0,0219 | 23747 | 0,000042 |
| 545 | | | 0,0296 | 36589 | 0,000029 |
| 549 | | | 0,0619 | 38669 | 0,002403 |
| 550 | | | 0,0641 | 39092 | 0,020854 |
| 551 | | | 0,0396 | 39191 | 0,015699 |
| 552 | | | 0,0245 | 39853 | 0,000417 |
| 553 | | | 0,0311 | 40087 | 0,001119 |
| 557 | | | 0,0136 | 51216 | 0,000135 |
| 558 | | | 0,0175 | 52220 | 0,004631 |
| 560 | | | 0,0115 | 59050 | 0,000356 |
| 562 | | 0,0749 | | 26295 | 0,013566 |
| 564 | | 0,0594 | | 27051 | 0,000070 |
| 565 | | 0,0521 | | 31622 | 0,000030 |
| 566 | | 0,0385 | | 35605 | 0,000716 |

Tabela 3 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos tetraploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Tetraploide | MM (kDa) | Anova |
|-----------------|-------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------|
| 567 | | 0,0262 | | 36570 | 0,001053 |
| 570 | | 0,0135 | | 54351 | 0,003509 |
| 573 | | 0,0159 | | 67255 | 0,000576 |
| 575 | | 0,0558 | | 121853 | 0,000232 |

Tabela 4 - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos hexaploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Hexaploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|---------|----------|------------|----------|----------|
| 1 | 2,3930 | 0,0843 | 0,0352 | 28133 | 0,006451 |
| 2 | 3,0237 | 0,3795 | 0,1255 | 55097 | 0,041427 |
| 6 | 3,2276 | 0,1241 | 0,0385 | 42902 | 0,002543 |
| 7 | 1,5200 | 0,2438 | 0,3706 | 56009 | 0,008263 |
| 14 | 2,1142 | 0,0886 | 0,0419 | 17888 | 0,014346 |
| 15 | 1,6748 | 0,0540 | 0,0323 | 45745 | 0,040102 |
| 18 | 1,7222 | 0,1342 | 0,2311 | 27923 | 0,002019 |
| 20 | 88,8420 | 3,8718 | 0,0436 | 54722 | 0,000036 |
| 21 | 2,1113 | 0,0440 | 0,0930 | 27097 | 0,006108 |
| 22 | 1,5770 | 0,0538 | 0,0341 | 26098 | 0,003381 |
| 26 | 2,8132 | 0,0768 | 0,0273 | 22780 | 0,001457 |
| 28 | 1,6525 | 0,1126 | 0,1860 | 21061 | 0,026896 |
| 31 | 2,8388 | 0,0323 | 0,0916 | 15675 | 0,009868 |
| 35 | 1,7308 | 1,6335 | 2,8273 | 16085 | 0,000312 |
| 40 | 1,5655 | 0,1945 | 0,1243 | 20336 | 0,006771 |
| 44 | 2,6237 | 0,0801 | 0,0305 | 24372 | 0,001007 |
| 48 | 1,5265 | 0,0969 | 0,0635 | 25095 | 0,007095 |
| 49 | 1,8388 | 0,0660 | 0,0359 | 25095 | 0,003158 |
| 50 | 1,9324 | 0,0897 | 0,0464 | 25860 | 0,017316 |
| 52 | 2,3115 | 0,2264 | 0,0980 | 26098 | 0,000192 |
| 53 | 3,1604 | 0,6427 | 0,2034 | 26559 | 0,000006 |
| 55 | 1,6255 | 0,0775 | 0,1260 | 26626 | 0,011442 |
| 70 | 2,0662 | 0,2358 | 0,1141 | 28511 | 0,002827 |
| 72 | 2,0855 | 0,1317 | 0,2746 | 28702 | 0,015962 |
| 75 | 1,7665 | 0,0843 | 0,1489 | 28702 | 0,013901 |
| 79 | 1,9109 | 0,0761 | 0,1454 | 29003 | 0,042585 |
| 83 | 1,5596 | 0,3751 | 0,2405 | 29210 | 0,001124 |
| 86 | 1,5516 | 0,2429 | 0,1566 | 29528 | 0,033391 |
| 87 | 1,6025 | 0,0766 | 0,0478 | 29726 | 0,003430 |
| 90 | 2,0105 | 0,1995 | 0,0993 | 29850 | 0,002452 |
| 93 | 3,4233 | 0,2875 | 0,0840 | 30047 | 0,001746 |
| 96 | 1,9834 | 0,0226 | 0,0448 | 30236 | 0,031705 |
| 98 | 1,5310 | 0,0508 | 0,0778 | 30641 | 0,007291 |
| 105 | 1,6068 | 0,0535 | 0,0333 | 31076 | 0,009021 |
| 108 | 1,5010 | 0,0438 | 0,0657 | 31615 | 0,029893 |
| 111 | 1,5425 | 0,1045 | 0,0677 | 32039 | 0,030903 |
| 113 | 1,7207 | 0,3368 | 0,1957 | 32493 | 0,035922 |
| 116 | 1,9450 | 0,0396 | 0,0770 | 32544 | 0,035429 |
| 129 | 1,6697 | 0,1074 | 0,0643 | 33976 | 0,018032 |
| 132 | 1,7972 | 0,0233 | 0,0419 | 32493 | 0,006109 |
| 133 | 1,5993 | 0,1063 | 0,0665 | 32544 | 0,020647 |
| 142 | 4,6762 | 0,1816 | 0,0388 | 33976 | 0,000020 |

Tabela 4 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos hexaploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Hexaploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|------------|----------|----------|
| 144 | 1,8080 | 0,1225 | 0,0677 | 36115 | 0,003860 |
| 146 | 1,6720 | 0,0926 | 0,0554 | 36370 | 0,009300 |
| 154 | 1,8890 | 0,0746 | 0,0395 | 37235 | 0,009462 |
| 162 | 2,2934 | 0,0610 | 0,0266 | 38539 | 0,000672 |
| 164 | 3,4862 | 0,0814 | 0,0233 | 38812 | 0,029154 |
| 169 | 4,0010 | 0,1126 | 0,0282 | 39579 | 0,001498 |
| 173 | 2,3095 | 0,0512 | 0,0222 | 39796 | 0,018797 |
| 175 | 3,7694 | 0,1271 | 0,0337 | 40583 | 0,001890 |
| 177 | 1,5887 | 0,2236 | 0,1407 | 40109 | 0,021567 |
| 179 | 1,7771 | 0,0421 | 0,0748 | 40710 | 0,004728 |
| 183 | 1,8754 | 0,1666 | 0,0888 | 40742 | 0,000807 |
| 185 | 1,7697 | 0,0612 | 0,1084 | 41094 | 0,017820 |
| 187 | 2,4476 | 0,3087 | 0,1261 | 40998 | 0,000217 |
| 190 | 2,2492 | 0,0356 | 0,0158 | 41417 | 0,013062 |
| 193 | 1,8287 | 0,3274 | 0,1791 | 41677 | 0,006992 |
| 197 | 3,1152 | 0,1187 | 0,0381 | 42401 | 0,005939 |
| 198 | 1,8724 | 0,0810 | 0,0433 | 42501 | 0,001107 |
| 199 | 1,5803 | 0,0923 | 0,0584 | 42401 | 0,043818 |
| 200 | 1,5740 | 0,0704 | 0,0447 | 42335 | 0,000475 |
| 208 | 2,5285 | 0,3278 | 0,1297 | 43511 | 0,001322 |
| 209 | 1,6782 | 0,0685 | 0,0408 | 43341 | 0,002606 |
| 210 | 1,8245 | 0,0646 | 0,0354 | 43341 | 0,005788 |
| 211 | 2,4273 | 0,6766 | 0,2787 | 43273 | 0,000264 |
| 212 | 1,9992 | 0,3736 | 0,1869 | 43647 | 0,000115 |
| 214 | 1,8870 | 0,1081 | 0,0573 | 43990 | 0,012174 |
| 215 | 1,7488 | 0,5901 | 0,3374 | 43750 | 0,001951 |
| 216 | 1,6650 | 0,5041 | 0,3028 | 43750 | 0,007507 |
| 221 | 2,1172 | 0,4805 | 0,2270 | 44197 | 0,002256 |
| 233 | 2,7423 | 0,0580 | 0,1591 | 47336 | 0,000218 |
| 236 | 2,4858 | 0,0174 | 0,0433 | 48185 | 0,007847 |
| 237 | 2,6112 | 0,1016 | 0,0389 | 48251 | 0,000354 |
| 240 | 3,2582 | 0,0216 | 0,0703 | 48715 | 0,005294 |
| 244 | 4,4254 | 0,0953 | 0,0215 | 48983 | 0,000009 |
| 247 | 1,5190 | 0,0304 | 0,0200 | 50204 | 0,020952 |
| 248 | 1,6830 | 0,0300 | 0,0505 | 50341 | 0,000144 |
| 258 | 1,8758 | 0,1042 | 0,0556 | 52092 | 0,002392 |
| 259 | 1,6821 | 4,7469 | 2,8221 | 52378 | 0,000217 |
| 260 | 2,3765 | 0,2456 | 0,1034 | 51879 | 0,001280 |
| 268 | 2,2420 | 0,0744 | 0,0332 | 55173 | 0,034191 |
| 274 | 1,7167 | 0,1852 | 0,3180 | 55627 | 0,012141 |
| 276 | 2,2705 | 0,1888 | 0,0831 | 55551 | 0,030012 |
| 277 | 4,0491 | 0,0872 | 0,0215 | 56625 | 0,020197 |

Tabela 4 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos hexaploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Hexaploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|--------|----------|------------|----------|----------|
| 278 | 3,9724 | 0,0804 | 0,0202 | 57014 | 0,001849 |
| 279 | 1,8687 | 0,0367 | 0,0196 | 57484 | 0,001684 |
| 281 | 4,4249 | 0,0270 | 0,0061 | 57799 | 0,024637 |
| 282 | 1,9872 | 0,0389 | 0,0196 | 57563 | 0,007205 |
| 288 | 2,0267 | 0,2090 | 0,1031 | 59078 | 0,000951 |
| 289 | 1,8181 | 1,4175 | 0,7797 | 58515 | 0,000212 |
| 293 | 1,6536 | 0,1203 | 0,0727 | 59159 | 0,005775 |
| 299 | 1,6700 | 0,0464 | 0,0278 | 61217 | 0,017941 |
| 301 | 4,2240 | 0,0137 | 0,0580 | 63260 | 0,000692 |
| 302 | 1,5162 | 0,0284 | 0,0187 | 63260 | 0,003757 |
| 303 | 1,6299 | 0,0210 | 0,0129 | 63520 | 0,006762 |
| 311 | 1,5337 | 0,0413 | 0,0269 | 64483 | 0,011617 |
| 315 | 1,5842 | 0,0573 | 0,0907 | 64926 | 0,000784 |
| 318 | 2,9183 | 0,0382 | 0,0131 | 66000 | 0,006082 |
| 324 | 3,8331 | 0,0304 | 0,0079 | 68048 | 0,000003 |
| 326 | 5,8492 | 0,0184 | 0,1078 | 68326 | 0,000560 |
| 330 | 3,8876 | 0,0107 | 0,0414 | 70590 | 0,004530 |
| 331 | 2,1495 | 0,0151 | 0,0325 | 70590 | 0,002358 |
| 332 | 1,7048 | 0,0280 | 0,0477 | 70734 | 0,027821 |
| 334 | 2,0187 | 0,0674 | 0,0334 | 72190 | 0,001970 |
| 340 | 1,5711 | 0,1191 | 0,1872 | 76117 | 0,000626 |
| 355 | 2,1499 | 0,0279 | 0,0130 | 81743 | 0,007766 |
| 362 | 2,1199 | 0,1690 | 0,0797 | 70590 | 0,007533 |
| 364 | 2,7424 | 0,0940 | 0,0343 | 70590 | 0,005367 |
| 365 | 2,0564 | 0,0294 | 0,0143 | 70734 | 0,026699 |
| 370 | 1,8694 | 0,0336 | 0,0179 | 72190 | 0,006329 |
| 378 | 2,1593 | 0,0270 | 0,0582 | 76117 | 0,024993 |
| 389 | 3,4485 | 0,2756 | 0,0799 | 81743 | 0,000319 |
| 396 | 2,1308 | 0,2355 | 0,1105 | 30809 | 0,001428 |
| 397 | 2,2217 | 0,1787 | 0,0805 | 32367 | 0,003302 |
| 400 | 1,8185 | 0,0103 | 0,0188 | 36399 | 0,008915 |
| 401 | 1,5179 | 0,1548 | 0,1020 | 36656 | 0,035544 |
| 407 | 1,6391 | 6,6394 | 4,0508 | 42467 | 0,005118 |
| 418 | 1,5091 | 0,0700 | 0,0464 | 57799 | 0,004657 |
| 440 | 1,8987 | 0,1153 | 0,2190 | 14539 | 0,022383 |
| 441 | 1,5830 | 0,0515 | 0,0816 | 16121 | 0,003960 |
| 450 | | | 0,0194 | 59870 | 0,000466 |
| 462 | | | 0,0959 | 15251 | 0,000333 |
| 464 | | | 0,0533 | 15765 | 0,000723 |
| 465 | | | 0,0728 | 16310 | 0,000170 |
| 466 | | | 0,0733 | 16378 | 0,000859 |
| 467 | | | 0,0549 | 17530 | 0,000070 |

Tabela 4 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos hexaploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Hexaploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|------|----------|------------|----------|----------|
| 471 | | | 0,1280 | 19590 | 0,000014 |
| 472 | | | 0,0862 | 19720 | 0,000215 |
| 473 | | | 0,0696 | 20117 | 0,001475 |
| 475 | | | 0,0327 | 23883 | 0,001209 |
| 476 | | | 0,0393 | 24042 | 0,000331 |
| 483 | | | 0,0477 | 25841 | 0,000155 |
| 496 | | | 0,0555 | 29580 | 0,001013 |
| 501 | | | 0,1725 | 30404 | 0,004644 |
| 506 | | | 0,0306 | 31020 | 0,000010 |
| 512 | | | 0,0741 | 32977 | 0,000709 |
| 517 | | | 0,0252 | 35768 | 0,004101 |
| 518 | | | 0,0164 | 36773 | 0,001699 |
| 519 | | | 0,0663 | 37162 | 0,000857 |
| 523 | | | 0,0495 | 38499 | 0,001139 |
| 528 | | | 0,0387 | 39055 | 0,001275 |
| 536 | | | 0,0282 | 41877 | 0,004096 |
| 538 | | | 0,0294 | 42441 | 0,020913 |
| 539 | | | 0,0186 | 42644 | 0,000263 |
| 543 | | | 0,0387 | 42890 | 0,007565 |
| 545 | | | 0,0599 | 43219 | 0,000290 |
| 547 | | | 0,0544 | 43343 | 0,009367 |
| 555 | | | 0,0956 | 44391 | 0,020324 |
| 563 | | | 0,0082 | 47417 | 0,004531 |
| 566 | | | 0,0467 | 47599 | 0,016068 |
| 567 | | | 0,0353 | 47690 | 0,030657 |
| 568 | | | 0,0207 | 47781 | 0,000002 |
| 571 | | | 0,0151 | 48471 | 0,000001 |
| 584 | | | 0,0839 | 52322 | 0,000002 |
| 592 | | | 0,0160 | 53999 | 0,000528 |
| 593 | | | 0,0199 | 54309 | 0,000073 |
| 594 | | | 0,0560 | 54257 | 0,000054 |
| 595 | | | 0,0168 | 54361 | 0,007064 |
| 597 | | | 0,0100 | 54883 | 0,004076 |
| 598 | | | 0,0086 | 54988 | 0,001943 |
| 599 | | | 0,0379 | 55093 | 0,000005 |
| 607 | | | 0,0173 | 54883 | 0,002596 |
| 612 | | | 0,0161 | 54988 | 0,000657 |
| 619 | | | 0,0232 | 55093 | 0,000794 |
| 627 | | | 0,0101 | 64812 | 0,026885 |
| 629 | | | 0,0152 | 67608 | 0,002998 |
| 652 | | | 0,0316 | 24465 | 0,000168 |
| 664 | | | 0,1151 | 18378 | 0,000039 |

Tabela 4 (continuação) - Análises de spots diferencialmente expressos (Match ID) com variação na porcentagem de volume entre os tratamentos hexaploide e diploide (Fold) e massa molecular (KDa), ANOVA ($p < 0,05$).

| Match ID | Fold | Diploide | Hexaploide | MM (kDa) | Anova |
|----------|------|----------|------------|----------|----------|
| 669 | | 0,1269 | | 26427 | 0,017199 |
| 672 | | 0,0440 | | 36714 | 0,000804 |
| 681 | | 0,0921 | | 86014 | 0,000024 |
| 692 | | 0,0412 | | 30569 | 0,019257 |
| 701 | | 0,1246 | | 19173 | 0,000021 |
| 702 | | 0,1022 | | 19864 | 0,000004 |
| 704 | | 0,1000 | | 27187 | 0,000084 |
| 706 | | 0,0651 | | 28110 | 0,000023 |
| 707 | | 0,0496 | | 28322 | 0,001315 |
| 708 | | 0,1082 | | 29825 | 0,001757 |
| 727 | | 0,0343 | | 63087 | 0,000460 |
| 731 | | 0,0267 | | 68326 | 0,000412 |
| 743 | | 0,0916 | | 129406 | 0,001248 |

APÊNDICE D

Análise de expressão das proteínas identificadas

Tabela 1 – Análise de expressão entre os *spots* de cada ploidia em comparação ao diploide de acordo com cada proteína identificada.

| Proteína | Ploidia comparada ao Diploide | Fold ⁽¹⁾ | Anova |
|--|-------------------------------|---------------------|----------|
| 6 Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, cloroplástica [<i>Erythranthe guttata</i>] | Aneuploide | 1,48392 | 0,289161 |
| | Triploide | 1,30192 | 0,340905 |
| | Tetraploide | 1,48909 | 0,138347 |
| | Hexaploide | 2,14805 | 0,039386 |
| 39 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,10306 | 0,174334 |
| | Triploide | 2,07462 | 0,00486 |
| | Tetraploide | 1,10667 | 0,581 |
| | Hexaploide | 1,01081 | 0,955051 |
| 40 Cadeia curta da ribulose bifosfato carboxilase | Aneuploide | 1,9892 | 0,01412 |
| | Triploide | 2,0682 | 0,08688 |
| | Tetraploide | 1,1748 | 0,42838 |
| | Hexaploide | 2,089 | 0,00734 |
| 69 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,3775 | 0,0314 |
| | Triploide | 1,4053 | 0,0098 |
| | Tetraploide | 1,4456 | 0,0181 |
| | Hexaploide | 1,52 | 0,0419 |
| 90 Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic (Fragment) | Aneuploide | 1,41939 | 0,533999 |
| | Triploide | 1,43153 | 5,15E-04 |
| | Tetraploide | 2,40092 | 1,02E-04 |
| | Hexaploide | 1,47253 | 0,046767 |
| 100 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | Aneuploide | 1,10348 | 0,657025 |
| | Triploide | 1,81984 | 0,003716 |
| | Tetraploide | 1,08313 | 0,678805 |
| | Hexaploide | 1,09557 | 0,604511 |
| 101 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,03686 | 0,477575 |
| | Triploide | 2,11313 | 0,032055 |
| | Tetraploide | 1,01013 | 0,867384 |
| | Hexaploide | 1,17987 | 0,375753 |
| 102 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,3775 | 0,0314 |
| | Triploide | 1,4053 | 0,0098 |
| | Tetraploide | 1,4456 | 0,0181 |
| | Hexaploide | 1,52 | 0,0419 |

Tabela 1 (continuação) – Análise de expressão entre os spots de cada ploidia em comparação ao diploide de acordo com cada proteína identificada.

| Proteína | Ploidia comparada ao Diploide | Fold⁽¹⁾ | Anova |
|---|--------------------------------------|---------------------------|--------------|
| 114 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,4978 | 2,98E-04 |
| | Triploide | 1,3086 | 0,0116 |
| | Tetraploide | 1,3248 | 0,03011 |
| | Hexaploide | 1,5588 | 0,03218 |
| 126 Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica | Aneuploide | 1,62994 | 0,007218 |
| | Triploide | 1,87136 | 7,43E-04 |
| | Tetraploide | 1,33502 | 0,058258 |
| | Hexaploide | 2,12057 | 0,009494 |
| 145 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | Aneuploide | 1,31971 | 0,153771 |
| | Triploide | 1,82851 | 0,001486 |
| | Tetraploide | 1,16117 | 0,246302 |
| | Hexaploide | 1,22708 | 0,213753 |
| 154 Anidrase Carbônica | Aneuploide | 1,00058 | 0,994086 |
| | Triploide | 1,88204 | 0,005846 |
| | Tetraploide | 1,20658 | 0,021 |
| | Hexaploide | 1,19052 | 0,032801 |
| 158 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | Aneuploide | 1,55931 | 0,061955 |
| | Triploide | 2,56275 | 0,003719 |
| | Tetraploide | 1,05675 | 0,77006 |
| | Hexaploide | 1,06936 | 0,894402 |
| 179 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,746 | 0,094016 |
| | Triploide | 3,52945 | 0,00932 |
| | Tetraploide | 1,20055 | 0,059302 |
| | Hexaploide | 1,07022 | 0,806792 |
| 186 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase | Aneuploide | 1,29795 | 0,051302 |
| | Triploide | 2,56801 | 0,001009 |
| | Tetraploide | 1,00134 | 0,992157 |
| | Hexaploide | 1,05583 | 0,767518 |
| 211 Fosfoglicerato quinase | Aneuploide | 2,25525 | 0,001944 |
| | Triploide | 1,09096 | 0,327152 |
| | Tetraploide | 1,20322 | 0,192439 |
| | Hexaploide | 1,03788 | 0,748459 |
| 212 Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase | Aneuploide | 1,15445 | 0,103621 |
| | Triploide | 1,65545 | 0,065353 |
| | Tetraploide | 1,40276 | 0,008526 |
| | Hexaploide | 1,67443 | 9,72E-05 |

Tabela 1 (continuação) – Análise de expressão entre os spots de cada ploidia em comparação ao diploide de acordo com cada proteína identificada.

| Proteína | Ploidia comparada ao Diploide | Fold ⁽¹⁾ | Anova |
|---|-------------------------------|---------------------|----------|
| 229 Frutose-bifosfato aldolase | Aneuploide | 1,51537 | 0,00389 |
| | Triploide | 1,58854 | 0,021101 |
| | Tetraploide | 1,30217 | 0,145924 |
| | Hexaploide | 1,54512 | 0,007527 |
| 270 Glutamina sintetase | Aneuploide | 1,69499 | 0,013087 |
| | Triploide | 1,80201 | 0,037678 |
| | Tetraploide | 1,90032 | 0,027982 |
| | Hexaploide | 1,4212 | 0,066166 |
| 274 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,11411 | 0,530503 |
| | Triploide | 1,42207 | 0,246318 |
| | Tetraploide | 1,5394 | 0,040236 |
| | Hexaploide | 1,46222 | 0,023276 |
| 289 ATP sintase subunidade alfa | Aneuploide | 1,18279 | 0,113312 |
| | Triploide | 1,31052 | 0,034315 |
| | Tetraploide | 1,14793 | 0,185186 |
| | Hexaploide | 1,451 | 0,024271 |
| 293 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,01404 | 0,935606 |
| | Triploide | 2,2728 | 0,273793 |
| | Tetraploide | 2,01424 | 7,35E-04 |
| | Hexaploide | 1,38765 | 0,023847 |
| 322 S-adenosilmetionina sintetase | Aneuploide | 1,64731 | 0,141157 |
| | Triploide | 1,63542 | 0,024868 |
| | Tetraploide | 1,70481 | 0,006569 |
| | Hexaploide | 2,29396 | 5,97E-04 |
| 325 Frutose-1,6-bifosfatase, cloroplástica [<i>Ipomoea nil</i>] | Aneuploide | 1,64301 | 0,001595 |
| | Triploide | 1,52684 | 0,007589 |
| | Tetraploide | 1,05278 | 0,541754 |
| | Hexaploide | 2,14079 | 0,011472 |
| 340 Proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico [<i>Erythranthe guttata</i>] | Aneuploide | 1,11968 | 0,220557 |
| | Triploide | 1,36846 | 0,06593 |
| | Tetraploide | 1,24859 | 0,068017 |
| | Hexaploide | 1,53558 | 0,041304 |
| 356 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,11411 | 0,530503 |
| | Triploide | 1,42207 | 0,246318 |
| | Tetraploide | 1,5394 | 0,040236 |
| | Hexaploide | 1,46222 | 0,023276 |

Tabela 1 (continuação) – Análise de expressão entre os spots de cada ploidia em comparação ao diploide de acordo com cada proteína identificada.

| Proteína | Ploidia comparada ao Diploide | Fold ⁽¹⁾ | Anova |
|---|-------------------------------|---------------------|----------|
| 359 Tubulina cadeia alfa | Aneuploide | 1,30324 | 0,186076 |
| | Triploide | 1,12087 | 0,460689 |
| | Tetraploide | 1,05707 | 0,77881 |
| | Hexaploide | 2,45169 | 0,015692 |
| 364 Proteína cognata de choque térmico 80 [<i>Ziziphus jujuba</i>] | Aneuploide | 1,49604 | 0,034885 |
| | Triploide | 1,47701 | 0,022445 |
| | Tetraploide | 1,1881 | 0,124078 |
| | Hexaploide | 2,33803 | 0,009497 |
| 372 Subunidade ATPase de protótipo de V tipo B2 [<i>Erythranthe guttata</i>] | Aneuploide | 1,11479 | 0,63347 |
| | Triploide | 1,44162 | 0,047881 |
| | Tetraploide | 1,02631 | 0,8789 |
| | Hexaploide | 1,6273 | 0,022158 |
| 378 ATP sintase subunidade alfa | Aneuploide | 1,65583 | 0,002518 |
| | Triploide | 1,18756 | 0,347706 |
| | Tetraploide | 1,01536 | 0,845857 |
| | Hexaploide | 1,25378 | 0,20745 |
| 386 Tubulina cadeia alfa | Aneuploide | 1,30324 | 0,186076 |
| | Triploide | 1,12087 | 0,460689 |
| | Tetraploide | 1,05707 | 0,77881 |
| | Hexaploide | 2,45169 | 0,015692 |
| 396 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,49782 | 2,98E-04 |
| | Triploide | 1,30858 | 0,011604 |
| | Tetraploide | 1,32476 | 0,030108 |
| | Hexaploide | 1,55878 | 0,032183 |
| 397 Subunidade de proteína de ligação à subunidade grande de RuBisCO beta, cloroplástica [<i>Erythranthe guttata</i>] | Aneuploide | 1,52485 | 0,029893 |
| | Triploide | 1,83063 | 0,014207 |
| | Tetraploide | 1,20126 | 0,118625 |
| | Hexaploide | 1,15686 | 0,329911 |
| 452 5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína metiltransferase [<i>Erythranthe guttata</i>] | Aneuploide | 2,01019 | 0,074433 |
| | Triploide | 2,30564 | 0,025388 |
| | Tetraploide | 1,65249 | 0,002039 |
| | Hexaploide | 1,75254 | 0,033972 |
| 497 Cadeia longa da ribulose bifosfato carboxilase (fragmento) | Aneuploide | 1,4978 | 2,98E-04 |
| | Triploide | 1,3086 | 0,0116 |
| | Tetraploide | 1,3248 | 0,03011 |
| | Hexaploide | 1,5588 | 0,03218 |

(1) Razão entre as porcentagens de volume analisadas nos spots

