



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

TESE DE DOUTORADO

VERÔNICA CRISTINA MAYRINCK VICTORIO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE TRIGO COMUM EM FUNÇÃO DA
APTIDÃO TECNOLÓGICA DO GRÃO: uma abordagem proteômica**

Rio de Janeiro
2021

Verônica Cristina Mayrinck Victorio

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE TRIGO COMUM EM FUNÇÃO DA
APTIDÃO TECNOLÓGICA DO GRÃO: uma abordagem proteômica**

***CHARACTERIZATION OF COMMON WHEAT PROTEIN PROFILE AS A FUNCTION
OF GRAIN TECHNOLOGICAL APTITUDE: a proteomic approach***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Simões Larraz Ferreira

Rio de Janeiro
2021

Catalogação informatizada pelo(a) autor(a)

V642 Victorio, Verônica Cristina Mayrinck
Caracterização do perfil proteico de trigo comum
em função da aptidão tecnológica do grão: uma
abordagem proteômica / Verônica Cristina Mayrinck
Victorio. -- Rio de Janeiro, 2022.
219 p.

Orientadora: Mariana Simões Larraz Ferreira.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição, 2022.

1. Análise proteômica. 2. Aptidão tecnológica de
farinhas de trigo. 3. Biomarcadores proteicos. 4.
Espectrometria de massas. 5. Química de cereais. I.
Ferreira, Mariana Simões Larraz, orient. II. Título.

Verônica Cristina Mayrinck Victorio

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE TRIGO COMUM EM FUNÇÃO DA
APTIDÃO TECNOLÓGICA DO GRÃO: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

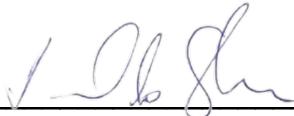
Aprovada em: 19 / 04 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Mariana Simões Larraz Ferreira

Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Dr. Vanildo Silveira

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Fábio César Sousa Nogueira

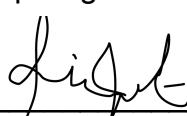
Dr. Fábio César Sousa Nogueira

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Dra. Cristina Yoshie Takeiti

Embrapa Agroindústria de Alimentos



Dr. Luiz Carlos Gutkoski

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Dedico este trabalho a Deus, Pai amantíssimo, que me dirigiu e sustentou até aqui. Gratidão por me mostrar que, contigo, eu posso realizar o que eu acreditava ser impossível. “TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE” (Filipenses 4:13)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPERJ e ao CNPq por financiarem essa pesquisa.

Ao prof. Dr. Luiz Carlos Gutkoski, à empresa OR Melhoramento de Sementes Ltda. e à Drª. Valérie Lullien-Pellerin pelo fornecimento das amostras.

À Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira, minha querida orientadora, por todo apoio, incentivo e carinho de sempre. Gratidão pelo seu esforço tão grandioso para me ajudar.

À Dra. Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves pelo incentivo para ingressar no doutorado e por toda ajuda nesta trajetória.

À Dra. Cristina Yoshie Takeiti e aos doutores Fábio César Souza Nogueira, Luiz Carlos Gutkoski e Vanildo Silveira, membros da banca examinadora, e às doutoras Andréa Furtado Macedo e Talita Pimenta do Nascimento, membros suplentes, por terem aceitado o convite e pelas contribuições que permitiram melhorar este trabalho.

Ao Dr. Gustavo Henrique Martins Ferreira Souza pelo direcionamento e por todo auxílio na execução deste trabalho.

Ao Dr. Vanildo Silveira e ao Dr. Felipe Astolpho de Almeida pela eficiência e rapidez com que executaram as análises e me auxiliaram no trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Bioativos I. Vocês são o extrato do que há de melhor em termos de cientistas! Agora é só tripsinizar e analisar por LC-MS e teremos a caracterização do melhor time no qual eu poderia trabalhar!

À equipe do Laboratório de Bioquímica de Proteínas.

Aos queridos técnicos Henrique Abreu e Matheus Grilo pela presteza em ajudar e pelas palavras de encorajamento.

À minha querida amiga Mônica Cristine, por me ouvir e incentivar sempre! Você é um grande exemplo para mim.

À Cinthia Couto, amiga e recém Doutora, que trilhou o caminho comigo desde o mestrado. Parabéns minha amiga! Que felicidade! Um brinde a nós!

À Cláudia Farina, Nathália Pereira, Valdemir Matos Souza, Rachel Marques e Renata do Nascimento, amigos de trabalho da Equipe de Nutrição do IEISS, por me apoiarem e torcerem por mim sempre. Vocês foram fundamentais para eu chegar até aqui.

Agradecimentos

À Isabel Amaral, Juliana Libório, Juliana Lyra, Karine Correa e Quésia Vieira, assistentes sociais e Beatriz Bezerra, fonoaudióloga do IEISS, por serem fechamento sempre.

A todos os meus amigos por me amarem e orarem por mim.

Aos meus amados pais Adilson Francisco Victorio e Selma Mayrinck Victorio por me darem a vida e fazer dela uma existência feliz a cada dia. É por vocês e para vocês que me esforço tanto. Essa vitória é nossa! Agora sim sou sua Doutorinha, maezinha!

Aos meus irmãos Adilson Victorio Júnior, Anselmo Mayrinck e Vera Lucia Mayrinck por torcerem por mim e se alegrarem com minhas vitórias. Amo muito vocês!

À minha querida Fabíola Felipe por ser essa *sister in law* e *belle soeur* tão amada!

A todos os meus sobrinhos e sobrinhos-netos por alegrarem minha vida.

À minha querida Bárbara Souza por ser minha amiga e continuar sendo minha fã todos esses anos. E, olha, eu também me orgulho muito de você!

Às minhas irmãs de vida Ana Paula Ramos e Marion Santana. Gratidão pela força e incentivo de sempre. Obrigada Mari, por emprestar sua casa para eu estudar e ainda fazer o almoço!

À minha prima Sandra Mendenque, por cuidar da Heleninha enquanto eu realizava este trabalho.

À Marisete Pio da Fonseca, minha sogrinha, por todo auxílio neste período. Gratidão por cuidar tão bem do nosso bem mais precioso.

Ao meu sogro Luiz Carlos da Fonseca e à Rosangela Sodré por entenderem as noites de luzes acesas e por cuidarem da Heleninha para eu trabalhar/estudar.

Ao Warllan Pio da Fonseca, meu marido lindo, por ter caminhado essa jornada comigo. Obrigada por entender as madrugadas em claro e o entra e sai do quarto para fazer a Helena dormir e voltar ao trabalho. Desejo que todo esse esforço seja muito bem recompensado.

À Helena Mayrinck Victorio Pio da Fonseca que me deu o mais grandioso título que tenho, o de MÃE. Você chegou no meio desta jornada e não a facilitou em nada, mas a fez muito mais feliz do que antes da sua chegada. Eu amo você infinita e eternamente!

E a todos que, de algum modo, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Deus abençoe cada um de vocês.

*“A gente demora a se tornar pesquisadora,
mas um dia a chave vira.”*

(Mariana Simões Larraz Ferreira)

VICTORIO, V.C.M.V. Caracterização do perfil proteico de trigo comum em função da aptidão tecnológica do grão: uma abordagem proteômica.

RESUMO

O trigo (*Triticum aestivum*) é um alimento básico de grande importância nutricional e econômica, sendo amplamente consumido e empregado em diversos produtos alimentícios. A aptidão do trigo para produção de bolos, biscoitos e massas está atrelada principalmente à fração proteica deste cereal. As proteínas de reserva conferem propriedades viscoelásticas, enquanto as proteínas metabólicas incluem enzimas que garantem o enovelamento adequado das proteínas de reserva. Sendo assim, o teor e o perfil proteico impactam na aptidão tecnológica do grão que, por sua vez, define a orientação final de uso do trigo. A espectrometria de massas (MS) oferece uma abordagem original para identificar proteínas diferenciais associadas à aptidão tecnológica. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os diferentes perfis proteicos de farinhas de trigo com aptidões tecnológicas contrastantes, aplicando proteômica comparativa não dirigida com base na cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas de alta definição com abordagem independente de dados. A identificação das proteínas diferencialmente abundantes revelou subunidades de glutenina e de pequenas proteínas de choque térmico como possíveis marcadores das farinhas de alta força do glúten, bem como puroindolininas e proteína de maciez do grão como possíveis marcadores das farinhas de baixa força do glúten. Por predição de domínios e avaliação da anotação funcional, foram reveladas diferentes funções proteicas e maior diversidade de processos biológicos nas amostras de maior força do glúten. A análise quimiométrica foi consistente com os demais resultados distinguindo e agrupando essas amostras com as de fenótipo *hard*. Conclui-se que os perfis proteicos diferentes permitiram a distinção entre as amostras de alta força do glúten daquelas de baixa força do glúten. Com resultados abrangentes, que podem ser aplicados em programas de melhoramento do trigo, esta tese permitiu avançar na compreensão do perfil proteico atrelado à aptidão tecnológica e ainda apresenta informações inéditas sobre o perfil proteico do trigo brasileiro.

Palavras-chave: ontologia genética, predição de domínios, proteoma do trigo, quimiometria.

Abstract

VICTORIO, V.C.M.V. Characterization of common wheat protein profile as a function of grain technological aptitude: a proteomic approach.

ABSTRACT

Wheat (*Triticum aestivum*) is a staple food of great nutritional and economic importance, being widely consumed and used in various food products. The aptitude of wheat to produce cakes, cookies and pasta is mainly linked to the protein fraction of this cereal. Storage proteins confer viscoelastic properties, while metabolic proteins include enzymes that ensure the correct folding of storage proteins. Thus, the protein content and profile impact the technological aptitude of the grain, which defines the final orientation of wheat use. Mass spectrometry (MS) offers an original approach to identify differential proteins associated with technological aptitude. The objective of this work was to characterize the different protein profiles of wheat flours with contrasting technological aptitudes, applying non-targeted comparative proteomics based on ultra-performance liquid chromatography coupled to high-definition mass spectrometry with data-independent approach. The identification of differentially abundant proteins revealed glutenin subunits and small heat shock proteins as possible markers of high gluten-force flours, as well as puroindolines and grain softness protein as possible markers of low gluten-force flours. By domain prediction and functional annotation evaluation, different protein functions and greater diversity of biological processes were revealed in samples of higher gluten-force. The chemometric analysis was consistent with the other results, distinguishing and grouping these samples with the hard phenotype ones. The different protein profiles allowed the distinction between the samples of high gluten-force from those of low gluten-force. With comprehensive results, which can be applied in wheat breeding programs, this thesis allowed the better understanding of the protein profile linked to technological aptitude and also presents new information about the protein profile of Brazilian wheat.

Keywords: domain prediction, chemometrics, genetic ontology, wheat proteome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1:

Figura 1. Estrutura da tese.....	28
Figura 2. O grão de trigo e suas diferentes camadas. Adaptado de Surget e Barron (2005).	35
Figura 3. Composição das proteínas do trigo: aproximação entre as classificações de Osborne (1907) e Shewry (1986).	37
Figura 4. Estruturas das α - e γ -gliadinas com ligações dissulfeto intramoleculares apresentadas por Wieser (2007).	39
Figura 5. Esquema proposto para as estruturas típicas de LMW-GS por D'ovidio & Masci (2004). As cisteínas são designadas por números ou de acordo com o sistema de letras proposto por Kohler <i>et al.</i> (1993). SH ou asterisco representam as cisteínas que formam pontes dissulfeto intermolecular. S, peptídeo sinal, N, N-terminal, REP, domínio repetitivo e C-TER, domínios C-terminal.	40

CAPÍTULO 2:

Fig. 1. Dynamic range of wheat flour samples, low (LW), medium (MD) and superior (SP) quality classification. The rank of identified proteins is plotted in the x axis and y axis is represented by the log of abundance quantified proteins.	64
Fig. 2. Principal component analysis (PCA) of wheat flour samples: low (LW), medium (MD) and superior (SP) quality classification. Identified and annotated proteins are in gray and red.	65
Fig. 3. Volcano plots comparing the wheat flour samples in pairs, low (LW), medium (MD) and superior (SP) ($p < 0.05$). The green dots represent up-regulated proteins (max fold change > 1.5), while red dots represent down-regulated proteins (max fold change < -1.5), black empty dots the considered unchanged proteins and gray empty dots were out of filters (minimum one unique peptide, two peptide count, CV of 0.3, max fold change < 1.5 , $P < 0.05$ and/or proteins in 3/3 replicates).	66
Fig. 4. Heat map illustrating the clustering of functional domains from uncharacterized differentially abundant proteins that were found in low (LW), medium	

(MD) and superior (SP) samples. The horizontal axis presents replicates from each sample and the vertical axis presents the domains. Color gradient represents the variation of protein abundance. Highest quantities are represented by dark red and lowest quantities by dark blue. PUF (protein of unknown function), GCK domain is related with intracellular signaling pathways. 70

Fig. 5. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis patterns of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) and low molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) from wheat genotypes. The numbers on the top of the figure represent the genotypes. The patterns are Bermude (1 and 12) and Toback (2 and 13). The analyzed genotypes are Campeiro (3), ORS 27 (5) and ORS 25 (7) of low quality, Marfim (4), ORS 1402 (6) and ORS 1401 (10) of medium quality and Jadeíte 11 (8), Ametista (9) and Guabiju (11) of superior quality. HMW-GS are labeled according to the nomenclature of Payne & Lawrence (1983). Unknown bands are marked by an interrogation point. 72

CAPÍTULO 3:

Graphical abstract 1. Summary of NanoUPLC-MS^E analysis of wheat flour. 54

Fig. 1. Dynamic range of wheat flour samples, low (LW), medium (MD) and superior (SP) quality classification. The rank of identified proteins is plotted in the x axis and y axis is represented by the log of abundance quantified proteins. 64

Fig. 2. Principal component analysis (PCA) of wheat flour samples: low (LW), medium (MD) and superior (SP) quality classification. Identified and annotated proteins are in gray and red. 65

Fig. 3. Volcano plots comparing the wheat flour samples in pairs, low (LW), medium (MD) and superior (SP) ($p < 0.05$). The green dots represent up-regulated proteins (max fold change > 1.5), while red dots represent down-regulated proteins (max fold change < -1.5), black empty dots the considered unchanged proteins and gray empty dots were out of filters (minimum one unique peptide, two peptide count, CV of 0.3, max fold change < 1.5 , $P < 0.05$ and/or proteins in 3/3 replicates). 66

Fig. 4. Heat map illustrating the clustering of functional domains from uncharacterized differentially abundant proteins that were found in low (LW), medium

(MD) and superior (SP) samples. The horizontal axis presents replicates from each sample and the vertical axis presents the domains. Color gradient represents the variation of protein abundance. Highest quantities are represented by dark red and lowest quantities by dark blue. PUF (protein of unknown function), GCK domain is related with intracellular signaling pathways..... 70

Fig. 5. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis patterns of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) and low molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) from wheat genotypes. The numbers on the top of the figure represent the genotypes. The patterns are Bermude (1 and 12) and Toback (2 and 13). The analyzed genotypes are Campeiro (3), ORS 27 (5) and ORS 25 (7) of low quality, Marfim (4), ORS 1402 (6) and ORS 1401 (10) of medium quality and Jadeíte 11 (8), Ametista (9) and Guabiju (11) of superior quality. HMW-GS are labeled according to the nomenclature of Payne & Lawrence (1983). Unknown bands are marked by an interrogation point. 72

CAPÍTULO 4:

Figure 1. Overview of the work and quality of proteomic data. (A) Schematic diagram of wheat flour sampling and untargeted proteomic workflow. (B) Number of identified and quantified proteins that appear in 3/3 replicates in each sample. (C) Dynamic range presenting more than 6 orders of magnitude ($\text{Log}_{10}>6$). The rank of identified proteins is expressed in the x axis, while log of normalized total ion count (TIC) abundance is in the y axis. NILs: near-isogenic lines, RWF: refined wheat flour and WWF: whole wheat flour.

..... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 2. Gene ontology (GO) association data for protein fraction of whole wheat flours (WWF, in orange) and refined wheat flours (RWF, in blue). (A and D) Pie charts represent the percentage of proteins associated or not with GO categories. (B and E) Venn diagrams show the number of proteins associated with biological process, molecular function and cellular component. (C and F) Bar charts show the number of proteins associated with the top 20 biological process.....

Figure 3. Volcano plots showing the differentially accumulated proteins between samples with contrasting gluten-force (A and B) and samples differing by PINB allele (C). The blue dots represent up-accumulated proteins (UP), while red dots represent down-

accumulated proteins (DOWN). Gray dots represented unchanged proteins and gray empty dots were out of p-value filter (p_{OUT} , $p > 0.05$). WWF: whole wheat flour; RWF: refined wheat flour; NILs: near-isogenic lines.....

Figure 4. Up accumulated proteins (UP) associated to biological processes in each sample. (A) whole wheat flour (WWF) high gluten-force (GF), (B) WWF low GF, (C) refined wheat flour (RWF) high GF, (D) RWF low GF, (E) RWF hard near-isogenic lines (NILs) and (F) RWF soft NILs..... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 5. Chemometric data obtained by Principal Component Analysis - PCA of (A) all samples, separation of whole wheat flours - WWF (triangle) and refined wheat flours – RWF (parallelogram); (B) RWF, separation of near isogenic lines - NILs (rectangle) from gluten-force (GF) based genotypes (trapezium) and by Partial Least Squares-Discriminant Analysis – PLS-DA (C) including all samples, highlighting the separation of high GF and hard-type phenotype (rounded rectangle) from those with low GF and soft-type phenotype (ellipse) along component 2, which was also marked in (D) the PLS-DA of RWF, along component 1; (E) PLS-DA of NILs and (F) PLS-DA of GF based samples.

CAPÍTULO 5

Figura. 1. Exemplo de espectro obtido por HDMS^E processados no programa DriftScope..... 87

Figura. 2. Cromatogramas das corridas de prospecção (*scouting run*) dos extratos sequenciais (AG, Gli, GS e GI) das amostras Campeiro e Ametista em TIC (*total ion count*). 88

Figura. 3. Cromatogramas das aquisições por HDMS^E dos extratos sequenciais (AG, Gli, GS e GI) das amostras Campeiro e Ametista em BPI (*base peak intention*).. 90

Figura. 4. Cromatogramas das aquisições por UDMS^E dos extratos sequenciais (AG, Gli, GS e GI) das amostras Campeiro e Ametista em BPI (*base peak intention*).. 91

Figura. 5. Espectros UDMS^E das aquisições em triplicata dos extratos AG1 (superiores) e Gli1 (inferiores), em roxo os peptídeos associados à identificação de proteínas..... 92

Figura. 6. Espectros UDMS ^E das aquisições em triplicata dos extratos GS1 (superiores) e GI1 (inferiores), em roxo os peptídeos associados à identificação de proteínas.....	93
Figura. 7. Comparação do número de identificações de peptídeos e proteínas em HDMS ^E e UDMS ^E nos extratos Albuminas/Globulinas (AG), Gliadinas (Gli), Gluteninas Solúveis (GS) e Gluteninas Insolúveis (GI).	94
Figura. 8. Comparação do número total de identificações de proteínas e peptídeos identificados com intervalo de confiança (IC) acima de 95%, em HDMS ^E e UDMS ^E	95
Figura. 9. Distribuição de fragmentação dos íons b (vermelho) e y (azul) obtidos nas corridas das amostras AG da variedade Ametista em HDMS ^E (superior) e UDMS ^E (inferior).	96
Figura. 10. Distribuição de fragmentação dos íons b (vermelho) e y (azul) obtidos nas corridas das amostras Gli (superior), GS (meio), GI (inferior) da variedade Ametista em HDMS ^E (esquerda) e UDMS ^E (direita).	97
Figura. 11. Total de proteínas identificadas em conjunto em 2 de 3 replicatas e em 3 de 3 replicatas.	98
Figura. 12. Proporção (eixo y) do número de peptídeos identificados por proteína (eixo x, 1 a 18).....	98
Figura. 13. Diagrama de Venn com todas as proteínas identificadas nos quatro extratos sequenciais para as duas variedades estudadas.	99

CAPÍTULO 6:

Fig. 1. Percentual de clivagem perdida comparando extratos digeridos com tripsina (Trip) e tripsina/Lys-C (Lys-C) em triplicata.	110
Fig. 2. Faixas dinâmicas obtidas com os métodos (A) MS ^E , para proteínas de reserva e (B) HDMS ^E , para proteínas totais.	111

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 1:**

Tabela 1. Produção e consumo de trigo em 2020/21	31
Tabela 2. Classes do trigo do Grupo II destinado à moagem e outras finalidades.	
.....	32
Tabela 3. Limites de tolerâncias para farinhas de trigo.	34

CAPÍTULO 3:

Table 1. Technological quality characterization of different Brazilian wheat genotypes according to rheological and physico-chemical parameters, harvest 2014/2015.....	59
Table 2. Differentially abundant and annotated proteins.....	68

CAPÍTULO 4:

Table. 1. List of selected differentially abundant proteins (DAPs) and exclusive proteins (EP) in each sample. Up-accumulated (UP) proteins with cellular response to unfolded protein and protein folding as biological process (BP) term and nutrient reservoir activity as molecular function (MF) term are shown. All exclusive proteins with maximum coefficient of variation of 0.3, irrespective of BP and MF, are presented.

CAPÍTULO 5:

Tabela. 1. Caracterização da qualidade tecnológica de duas cultivares de trigo brasileiro, segundo parâmetros reológicos e físico-químicos.	83
Tabela. 2. Lista das proteínas de reserva identificadas nos diferentes extratos.	101

CAPÍTULO 6:

Tabela: 1. Resumo das abordagens proteômicas utilizadas para caracterizar proteínas do trigo.....	113
Tabela: 2. Principais resultados ligados aos objetivos alcançados.	114

LISTA DE SIGLAS

A/G	Albuminas/globulinas (<i>albumins/globulins</i>)
AACCI	American Association of Cereal Chemists International
ALPs	<i>Avenin-like proteins</i>
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato (<i>adenosine triphosphate</i>)
AVE	Média (<i>Average</i>)
BP	processo biológico (<i>biological process</i>)
C	Cisteína
CC	Componente celular (<i>celular component</i>)
CD	<i>Celiac disease</i>
CRT	calreticulin
CV	Coeficiente de variação (<i>coefficient of variation</i>)
DAP	Proteínas diferencialmente abundantes/acumuladas (<i>differentially abundant proteins/differentially accumulated proteins</i>)
DIA	Aquisição independente de dados (data-independent acquisition)
DOWN	<i>Down-regulated proteins</i> ou <i>down-accumulated proteins</i>
DTT	Ditiotreitol (<i>dithiothreitol</i>)
EP	proteínas exclusivas (<i>exclusive proteins</i>)
FDR	Taxa de descoberta falsa (<i>false discovery rate</i>)
GF	<i>Gluten-force</i>
GFP	[Glu1]-Fibrinopeptide B human ([Glu1]-Fibrinopeptide B human)
GI	Gluteninas insolúveis
Gli	Gliadinas
GO	<i>Gene ontology</i>
GS	Gluteninas solúveis
GSP	<i>Grain softness protein</i>
HDMS	<i>High-definition mass spectrometry</i>
HDMS ^E	<i>High-definition mass spectrometry multiplex method</i>
HMW-GS	Subunidades de glutenina de alta massa molecular (<i>low-molecular weight glutenin subunit</i>)
HSPs	Proteínas de choque térmico (<i>heat shock proteins</i>)
IAM	Iodoacetamida (<i>iodoacetamide</i>)
IMS	Espectrometria por mobilidade iônica (<i>ion mobility spectrometry</i>)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (<i>liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
LMW-GS	Subunidades de glutenina de baixa massa molecular (<i>low-molecular weight glutenin subunit</i>)
LW	<i>Low</i>
M	Metionina
m/z	relação massa/carga
MD	Média
MF	Função molecular (<i>molecular function</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (<i>tandem mass spectrometry</i>)

MS ^E	<i>Mass spectrometry multiplex method</i>
Mt	Milhões de toneladas
NA	Não associado (<i>not associated</i>)
NH4HCO3	Bicarbonato de amonio
NILs	Linhagens quase-isogênicas (<i>near-isogenic lines</i>)
P	Prolina
PC	Componente principal (<i>principal component</i>)
PCA	Análise de componentes principais (<i>principal component analysis</i>)
PDI	Proteína dissulfeto isomerase (<i>protein disulfide isomerase</i>)
PH	Peso do hectolitro
PINA	Puroindolina-A (<i>puroindoline-A</i>)
PINB	Puroindolina-B (<i>puroindoline-B</i>)
PINs	Puroindolinas (<i>puroindolines</i>)
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (<i>partial least squares discriminant analysis</i>)
PU	Peptídeos únicos (<i>unique peptides</i>)
Q	Glutamina
RP	Peptídeos relatados (<i>reported peptides</i>)
RWF	<i>Refined wheat flours</i>
S	Serina
SC	cobertura de sequência (<i>sequence coverage</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SP	Superior
T	Treonina
TFA	Ácido trifluoracético (<i>trifluoracetic acid</i>)
TIC	Contagem total de íons (<i>total ion count</i>)
TOF	Tempo de voo (<i>time-of-flight</i>)
UP	Proteínas superexpressas (<i>up-regulated ou up-accumulated proteins</i>)
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance (<i>ultraprecision liquid chromatography</i>)
VIP	Importância variável na projeção (<i>variable importance in projection</i>)
WWF	<i>Whole Wheat Flours</i>
Y	Tirosina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	22
CAPÍTULO 1 – O TRIGO.....	30
1 O TRIGO.....	30
1.1 PRODUÇÃO E CONSUMO	30
1.2 PADRÃO DE QUALIDADE DO TRIGO E DA FARINHA DE TRIGO NO BRASIL	32
1.3 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GRÃO.....	35
1.4 PROTEÍNAS DO TRIGO E SEU IMPACTO NA APTIDÃO TECNOLÓGICA DO GRÃO	36
1.4.1 Proteínas metabólicas.....	37
1.4.2 Proteínas de Reserva	38
1.4.3 Impacto das proteínas metabólicas e de reserva na aptidão tecnológica do grão de trigo	41
CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE TRIGO E DE OUTROS CEREAIS POR ABORDAGEM PROTEÔMICA.....	44
2 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE TRIGO E DE OUTROS CEREAIS POR ABORDAGEM PROTEÔMICA	44
2.1 DESAFIOS PARA ANÁLISE PROTEÔMICA DO TRIGO	44
2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	46
2.3 ESTRATÉGIAS E MÉTODOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS..	48
2.4 ABORDAGEM PROTEÔMICA EM TRIGO E OUTROS CEREAIS	49

CAPÍTULO 3 – NanoUPLC-MS^E REVEALS DIFFERENTIAL ABUNDANCE OF GLUTEN PROTEINS IN WHEAT FLOORS OF DIFFERENT TECHNOLOGICAL QUALITIES	54
HIGHLIGHTS.....	54
GRAPHICAL ABSTRACT	54
ABSTRACT	55
1 INTRODUCTION.....	56
2 MATERIALS AND METHODS.....	58
2.1 PLANT MATERIAL	58
2.2 PROTEINS EXTRACTION	59
2.3 SAMPLE PREPARATION FOR NanoUPLC-MS ^E ANALYSIS	60
2.4 NanoUPLC-MS ^E ANALYSIS.....	60
2.5 DATA PROCESSING	61
2.6 1D SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (1D SDS-PAGE).....	62
2.7 STATISTICAL ANALYSIS	63
3 RESULTS AND DISCUSSION	63
3.1 NanoUPLC-MS ^E RESULTS.....	63
3.1.1 Protein profile cluster of nanoUPLC-MS ^E data.....	65
3.2 PROTEIN ABUNDANCE PROFILES OF SAMPLES COMPARED IN PAIRS	66
3.2.1 Cluster of functional domains of differentially abundant and not described proteins	69
3.3 GLUTENIN SUBUNITS CHARACTERIZATION BY ELECTROFORESIS	
71	
4 CONCLUSIONS.....	72

ACKNOWLEDGEMENTS.....	73
CAPÍTULO 4 – UNTARGETED PROTEOMICS UNRAVELS THE PROTEIN PROFILE OF WHEAT FLOURS OF CONTRASTING TRAITS BASED ON GLUTEN-FORCE AND NEAR-ISOGENIC LINES DIFFERING BY <i>PINB-D1</i> ALLELE.....	74
ABSTRACT	74
CAPÍTULO 5 – COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADOS PARA MELHOR CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO TRIGO: HDMS^E x UDMS^E.....	75
RESUMO	75
ABSTRACT	76
1 INTRODUÇÃO.....	78
2 METODOLOGIA	80
2.1 MATERIAL VEGETAL	80
2.2 REAGENTES QUÍMICOS	80
2.3 ALQUILAÇÃO E EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DAS PROTEÍNAS DE FARINHA DE TRIGO	81
2.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	82
2.5 ETAPA DE LAVAGEM (<i>CLEAN-UP</i>)	84
2.6 DIGESTÃO TRÍPTICA.....	84
2.7 AQUISIÇÃO EM 1D NanoUPLC-MS ^E	85
2.8 ETAPA DE SCOUTING RUN	85
2.9 MÉTODOS HDMS ^E E UDMS ^E	86
2.10 PROCESSAMENTO DE DADOS	87
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4 CONCLUSÃO	106
AGRADECIMENTOS.....	106

CAPÍTULO 6- DISCUSSÃO	108
6 DISCUSSÃO	108
6.1 PRINCIPAIS DESAFIOS ENCONTRADOS	108
6.2 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PORTEICO DAS AMOSTRAS DE DIFERENTES APTIDÕES TECNOLÓGICAS ...	111
6.3 PRINCIPAIS RESULTADOS	114
CAPÍTULO 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
REFERÊNCIAS	118
APÊNDICES	130

INTRODUÇÃO

A ampla utilização do trigo na dieta humana está relacionada às suas características viscoelásticas únicas que permitem seu emprego em vários produtos, incluindo massas, pães e outros produtos de panificação (BÉKÉS, 2012; VENSEL *et al.*, 2014). Essa versatilidade faz do trigo uma matriz alimentícia de grande importância econômica e nutricional cuja produção mundial ultrapassa 700 milhões de toneladas (Mt) por ano. No Brasil, a estimativa da produção de trigo para o ano de 2022 é de aproximadamente 7,9 Mt, o que o faz ser o terceiro cereal em produção no país, atrás apenas do milho (112 Mt) e do arroz (10,6 Mt). No entanto, a demanda de trigo, estimada em 12,7 Mt, é muito superior à produção e o país necessita importar o cereal para garantir segurança alimentar à população (CONAB, 2022a).

Producir trigo de forma competitiva e sustentável tem sido um dos principais desafios da agricultura brasileira, não somente no que tange técnicas de cultivo adequadas, mas também na obtenção de bons rendimentos e aptidão tecnológica (PIRES *et al.*, 2011). A aptidão tecnológica define a orientação industrial de uso do trigo (PIRES *et al.*, 2011) e está relacionada com o teor e a qualidade de suas proteínas. Em grãos maduros, as proteínas metabólicas (albuminas e globulinas, A/G) ou não-prolamina, compreendem de 15 a 20 % do total de proteína do grão. São compostas por proteínas monoméricas fisiologicamente ativas ou estruturais, representadas principalmente por enzimas metabólicas, reguladoras e protetoras (GOESAERT *et al.*, 2005; HILL *et al.*, 2008; SAULNIER, 2012). Enquanto que as proteínas de reserva ou prolamina representam 80-85%, sendo compostas por subunidades monoméricas, gliadinas, capazes de formar pontes dissulfeto intramoleculares, e polipeptídeos de gluteninas, formados por subunidades de alta e baixa massa molecular, estabilizados por pontes dissulfeto intermoleculares (WIESER, 2007).

Ambas as frações proteicas, prolamina e não-prolamina possuem propriedades que são determinantes para a aptidão tecnológica do trigo. A relação das proteínas de reserva (prolamina) com a qualidade da farinha há tempos tem sido estudada (AGHAGHOLIZADEH *et al.*, 2017; BARAK *et al.*, 2013; PAYNE, 1987; POPINEAU *et al.*, 1994a). Enquanto as gliadinas fornecem plasticidade/viscosidade, as gluteninas contribuem para a força e elasticidade das massas de farinha de trigo e uma relação

gliadina/glutenina adequada é importante para a qualidade da proteína do glúten na panificação (BARAK *et al.*, 2013; GOESAERT *et al.*, 2005). Ressalta-se que, a presença de subunidades específicas dessas proteínas pode ser mais importante do que a quantidade total delas (LIU *et al.*, 2012). Por exemplo, na panificação, uma maior quantidade de subunidades de glutenina de alta massa molecular (*high molecular weight - glutenin subunits*, HMW-GS) levou a um melhor volume do pão e menor firmeza do miolo (BARAK *et al.*, 2013).

No que tange às proteínas metabólicas, determinadas proteínas podem impactar na aptidão tecnológica do grão pela função que exercem. Foi relatada a participação de chaperonas e isomerases, como a proteína dissulfeto isomerase (PDI), no enovelamento adequado das proteínas de reserva (KIMURA *et al.*, 2015; OSIPOVA *et al.*, 2012). Enquanto PDI participa do enovelamento tridimensional e assegura que as pontes dissulfeto aconteçam corretamente (DONG *et al.*, 2012; OSIPOVA *et al.*, 2012), proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSPs) atuam no reenovelamento de proteínas e as proteínas de choque térmico de baixa massa molecular (*small HSPs*) ligam-se e sequestram proteínas com enovelamento incorreto (MOGK *et al.*, 2019). Outras proteínas dessa fração, as puroindolininas (PINs), são conhecidas por influenciar a dureza do grão alterando a textura do endosperma (PAULY *et al.*, 2013), bem como podem afetar o comportamento agregativo de proteínas de reserva (GENEIX *et al.*, 2020; LESAGE *et al.*, 2012).

No Brasil, análises físico-químicas e reológicas são amplamente empregadas para avaliação da aptidão tecnológica do trigo e objetivam caracterizar as propriedades do grão, da farinha e o comportamento da massa por meio de análises como, por exemplo, alveografia e farinografia (AACCI, 2010). No entanto, aspectos como o teor de proteína total, relação gliadina/glutenina, presença de ligações cruzadas por pontes dissulfeto intermoleculares, porcentagem de massa extraível do macropolímero de glutenina subunidades de gliadinas e gluteninas são os principais fatores investigados para compreensão do papel das proteínas na aptidão tecnológica do trigo, principalmente para panificação (LANGENKÄMPER; ZÖRB, 2019).

Sabe-se que a análise de proteínas é uma tarefa complexa devido às inúmeras possibilidade de combinações aminoacídicas e pela complexidade das interações

proteicas e enzimáticas (SOUZA *et al.*, 2017). A análise das proteínas de reserva do trigo apresenta dificuldades adicionais devido às limitações dos bancos de dados disponíveis e à presença de conjuntos de proteínas homólogas (AGHAGHOLIZADEH *et al.*, 2017). Neste sentido, abordagens proteômicas com base em técnicas sensíveis e confiáveis, revelam-se como importantes ferramentas de análise das proteínas do trigo (BROMILOW *et al.*, 2017b; VICTORIO *et al.*, 2018). A espectrometria de massas (*Mass Spectrometry, MS*) é a principal ferramenta para análises proteômicas em larga escala por apresentar alto rendimento de identificação e expressão de proteínas e também por fornecer informações detalhadas sobre interações proteína-proteína e modificações pós-traducionais (CUNSOLO *et al.*, 2014; DISTLER *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2014).

A caracterização de amostras complexas é facilitada pela utilização de métodos conhecidos como aquisição independentes de dados (*Data-Independent Aquisition, DIA*), onde todos os íons gerados na fonte são transmitidos até a célula de colisão, que alterna entre baixa e alta energia, gerando dados de massa exata de precursores e fragmentos simultaneamente (DISTLER *et al.*, 2014; GEROMANOS *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2017). Esses métodos podem ainda ser complementados pela espectrometria por mobilidade iônica (*Ion Mobility Spectrometry, IMS*) que permite a separação adicional de íons que apresentam a mesma relação massa/carga (DISTLER *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017).

Recentemente, estudos baseados em abordagens ômicas demonstraram a existência de diferentes perfis proteicos e de compostos bioativos e alergênicos em amostras de trigo brasileiro de diferentes aptidões tecnológicas (ALVES *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2022; VICTORIO *et al.*, 2018). Mais especificamente, ferramentas proteômicas foram aplicadas com sucesso no estudo das proteínas metabólicas, mostrando que as farinhas classificadas como fortes em relação à força do glúten apresentaram perfil proteico diferente daquelas de menor força do glúten (VICTORIO *et al.*, 2018). Visando contribuir neste campo de pesquisa, este trabalho teve como ponto de partida o estudo, por meio de abordagem proteômica, do perfil proteico de farinhas de trigo em função da aptidão tecnológica das amostras.

Esta tese de doutorado faz parte do projeto de pesquisa “Metabolômica e proteômica de alimentos”, cujo foco é a aplicação de ferramentas “ômicas” para gerar resultados inovadores na análise de alimentos e está atrelado à linha de pesquisa

“Processamento, qualidade, valorização de alimentos, coprodutos e resíduos” do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN). Seguindo essa linha, duas hipóteses nortearam este trabalho: i) existem diferenças no perfil proteico que explicam as diferentes aptidões tecnológicas do trigo; ii) a caracterização do perfil proteico de farinhas de trigo pela utilização de abordagem proteômica pode revelar possíveis marcadores proteicos relacionados à aptidão tecnológica do trigo.

Neste contexto, o objetivo central deste trabalho foi caracterizar os diferentes perfis proteicos de farinhas de trigo com aptidões tecnológicas contrastantes, aplicando proteômica comparativa não dirigida com base na cromatografia líquida de ultra performance (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, NanoUPLC) acoplada à espectrometria de massas de alta definição (*High Definition Mass Spectrometry*, HDMS) com abordagem independente de dados.

Assim, alguns objetivos específicos puderam ser definidos: i) Revelar os diferentes perfis proteicos de amostras de farinha de trigo comum evidenciando as proteínas que contribuem para a aptidão tecnológica e uso final da farinha; ii) Identificar e quantificar proteínas do glúten em amostras agrupadas por diferentes aptidões tecnológicas distinguindo os perfis proteicos; iii) Revelar e avaliar o perfil proteico de amostras de farinha de trigo com força do glúten contrastantes (farinhas integrais e refinadas) e de farinhas refinadas de linhagens quase-isogênicas com fenótipos diferentes; iv) Apresentar e comparar métodos de aquisição de alta definição em NanoUPLC-MS/MS que permitem caracterização das proteínas do trigo.

Com esta pesquisa, buscou-se aprimorar o conhecimento sobre a aptidão tecnológica do trigo com base na expressão diferencial e na categorização funcional das proteínas das diferentes amostras de farinha de trigo.

Este manuscrito é composto por 7 capítulos divididos em 3 partes principais. A primeira parte foi destinada à revisão bibliográfica direcionada aos temas que embasam a produção científica obtida com esta tese. Os primeiros pontos abordados (capítulo 1) versam sobre a importância e padrão de qualidade do trigo, bem como sobre a estrutura do grão, suas frações proteicas e o impacto destas na aptidão tecnológica do grão. No capítulo 2 estão apresentadas as temáticas ligadas à análise das proteínas de trigo e de outros cereais utilizando abordagem proteômica: principais desafios encontrados para

análise das proteínas do trigo, apresentação da técnica de cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas de alta definição (do inglês, UPLC-HDMS), apresentação das estratégias e métodos em MS, como o uso da abordagem DIA, IMS e os diferentes métodos MS^E que permitem alavancar a análise da complexa fração proteica do trigo e a utilização da abordagem proteômica em cereais.

A segunda parte trata da produção científica gerada a partir das análises experimentais conduzidas durante o desenvolvimento da tese. Neste sentido, estão apresentados três artigos originais. O primeiro (capítulo 3), foi publicado na revista *Journal of Proteomics* (FI:4.044; Qualis único CAPES A1) e intitula-se *NanoUPLC-MS^E reveals differential abundance of gluten proteins in wheat flours of different technological qualities*. Neste artigo foi aplicada a técnica hifena nanoUPLC-MS^E em busca da melhor compreensão das proteínas de reserva do trigo em amostras de diferentes aptidões tecnológicas, previamente classificadas pela força do glúten em fraca, média e forte. Os resultados apontaram a distinção do perfil proteico das amostras de mais baixa força do glúten em comparação ao das amostras com elevada força do glúten. Além disso, o trabalho mostrou a efetividade da aplicação de nanoUPLC-MS^E para caracterização do glúten, contribuindo para a consolidação das pesquisas no campo da aptidão tecnológica do trigo e trazendo informações inéditas principalmente sobre o trigo brasileiro.

Compõe o capítulo 4, o artigo intitulado *Untargeted proteomics unravels the protein profile of wheat flours in contrasting gluten-force genotypes and near-isogenic lines differing by Pinb-D1 allele*, que será submetido à revista *Food Chemistry* (FI:7.514; Qualis único CAPES A1). Neste trabalho, foram analisadas amostras brasileiras de farinha de trigo integral e refinada com características contrastantes em termos de força do glúten, além de duas amostras de origem francesa de farinha de trigo refinada que diferiam pelo alelo *Pinb-D1*, que codifica puroindolina B, conferindo textura *hard* ou *soft* ao grão. Como principal resultado, as amostras apresentaram diferentes perfis proteicos apontando marcadores específicos de amostras contrastantes. Maior expressão de gliadinas, LMW-GS, HMW-GS e *small HSPs* (do inglês, *small heat shock proteins*) foi verificada em amostras de alta força do glúten, enquanto as amostras de baixa força do glúten expressaram mais PINA, PINB2 e GSP (do inglês, *grain softness protein*). Finalmente, as

amostras que apresentavam alta força do glúten e fenótipo *hard* foram agrupadas e separadas de seus pares com características contrastantes por análise quimiométrica. Assim, o trabalho apontou proteínas que podem ser usadas como possíveis biomarcadores para reconhecimento de aptidão tecnológica.

Por fim, o artigo que compõe o capítulo 5 foi publicado como um capítulo no livro Nutrição em foco: uma abordagem holística, volume III, Editora Conhecimento Livre, com o título: *Comparação de dois métodos de espectrometria de massas aplicados para melhor caracterização das proteínas do trigo: HDMS^E x UDMS^E*. Neste trabalho foram analisadas duas amostras de trigo brasileiro com aptidões tecnológicas contrastantes por nanoUPLC acoplada à espectrometria de massas. Foram comparados dois métodos DIA, o de alta definição - *High Definition MS^E* (HDMS^E) e o de ultra definição - *Ultra Definition MS^E* (UDMS^E), que utiliza o sistema de mobilidade iônica onde os íons dos peptídeos são separados em função de sua conformação tridimensional. Os resultados evidenciaram a superioridade do método UDMS^E em termos da cobertura de sequências proteicas, em virtude da melhor eficiência na fragmentação. Ao fornecer novas perspectivas para avaliação da aptidão tecnológica do trigo, este trabalho contribuiu com a pesquisa e a inovação na cadeia produtiva do cereal.

No intuito de articular os dados apresentados nos capítulos de produção científica, foi adicionado na terceira parte deste trabalho, um capítulo de discussão (capítulo 6) que une os principais resultados encontrados para melhor entendimento do perfil proteico de amostras de farinha e, consequentemente, da aptidão tecnológica do trigo. Por fim, o capítulo 7 foi dedicado às considerações finais deste trabalho.

A seguir, é apresentada a estrutura da tese (Figura 1).

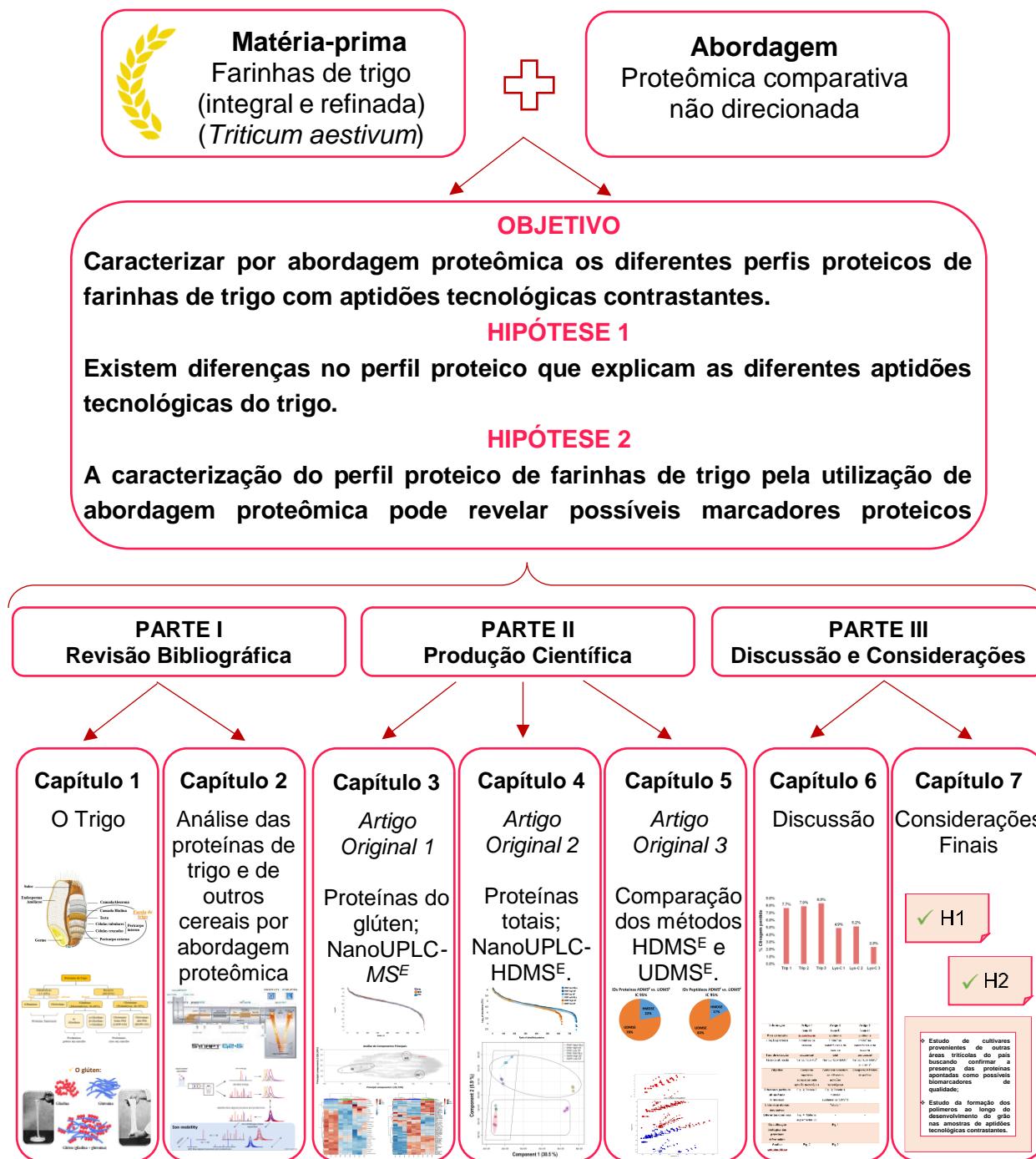


Figura 1. Estrutura da tese.

PARTE I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1. O TRIGO

**CAPÍTULO 2. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE TRIGO E DE OUTROS CEREAIS POR
ABORDAGEM PROTEÔMICA**

CAPÍTULO 1 – O TRIGO

- 1.1 Produção e consumo;
 - 1.2 Padrão de qualidade do trigo e da farinha de trigo no Brasil
 - 1.3 Estrutura e composição química do grão;
 - 1.4 Proteínas do trigo e seu impacto na aptidão tecnológica do grão
-

1 O TRIGO

1.1 PRODUÇÃO E CONSUMO

O trigo é um cereal pertencente à família botânica Poaceae, à subfamília Pooideae e ao gênero *Triticum*. Os tipos de trigo de maior interesse comercial são o trigo comum (*Triticum aestivum*), espécie hexaploide (AABBDD), mais utilizada na panificação, produção de bolos, biscoitos, massas e produtos de confeitoraria, e o trigo duro (*Triticum durum*), espécie tetraploide (AABB), especialmente destinada ao preparo de massas alimentícias (SERNA-SALDIVAR, 2010; SHEWRY, 2009). O trigo é amplamente utilizado na alimentação humana na forma de grão laminado ou na forma de farinha. Além do uso nos produtos citados, pode ser usado como agente espessante em molhos, sopas, pudins e recheios de tortas (BORÉM; SCHEEREN, 2015).

A possibilidade de aplicação em diversos produtos alimentícios e o amplo consumo mundial (de mais de 769 Mt) fazem do trigo um alimento básico de grande importância econômica e nutricional. A produção mundial do cereal, considerando os anos de 2020/21, foi em torno de 773 Mt, com aumento de 4,6% na produção nos últimos 5 anos (ABITRIGO, 2022) e a estimativa de produção para 2022 é de 790 Mt (FAO, 2022). Países como Canadá, Estados Unidos, Índia, Rússia e Ucrânia e a União Europeia possuem a produção maior do que o consumo, enquanto no Brasil a produção representa apenas cerca de 51% da demanda (tabela1) (ABITRIGO, 2022).

Tabela 1. Produção e consumo de trigo em 2020/21.

Local	produção (Mt)	consumo (Mt)
Brasil	6,300	12,200
Canadá	35,183	10,000
China	136,000	140,000
Estados unidos	49,691	21,380
Índia	107,592	103,017
rússia	84,000	41,500
Ucrânia	25,500	8,100
união europeia	135,800	118,500
total mundial	773,663	769,320

Fonte: Serviço Agrícola Estrangeiro - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. 16/02/2021 (ABITRIGO, 2022).

No Brasil, o cultivo de trigo é direcionado para a espécie *T. aestivum*, sobretudo por imposições edafoclimáticas (solo, clima, temperatura e foto exposição), sendo classificado como uma cultura de inverno. Apesar de ser uma cultura de baixa necessidade hídrica, a estiagem e a baixa precipitação diminuem o rendimento, bem como geadas na fase reprodutiva e altas temperaturas, também são prejudiciais (CONAB, 2022b). Contudo, os esforços dos programas de melhoramento genético e as melhorias nos sistemas de produção têm proporcionado aumento do rendimento do trigo (BORÉM; SCHEEREN, 2015). Com isso, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o trigo é o quarto grão em termos de produção no país, ficando atrás apenas da soja (leguminosa; 125,47 Mt) e dos cereais milho (112,34 MT) e arroz (10,56). A produção de trigo está estimada em cerca de 7,98 Mt para o ano de 2022 e, diferente do que ocorre para outros grãos, a demanda do trigo supera a sua produção. Dessa forma, para suprir o consumo de cerca de 12,7 Mt, em 2022 está prevista a importação de 6,5 Mt de trigo (CONAB, 2022a).

No Brasil, o melhoramento de trigo é realizado por empresas públicas (ex. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA e Fundação Estatal de Pesquisa Agropecuária do Rio grande do Sul - FEPAGRO) e privadas (ex. OR Melhoramento de

Sementes e Biotrigo Genética). Os principais objetivos do melhoramento de trigo são a avaliação e a identificação de novos materiais com genes de características importantes de resistência, de adaptação, de produtividade e/ou aptidão tecnológica de uso (BORÉM; SCHEEREN, 2015).

1.2 PADRÃO DE QUALIDADE DO TRIGO E DA FARINHA DE TRIGO NO BRASIL

No Brasil, os parâmetros de qualidade do trigo são definidos pelo Regulamento Técnico do Trigo estabelecido pela Instrução Normativa (IN) nº 38 (BRASIL, 2010) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que classifica o trigo em grupos, classes e tipos. Quanto aos grupos, são dois: I – trigo destinado diretamente à alimentação humana e II – trigo destinado à moagem e outras finalidades. O trigo do grupo II é classificado em classes, segundo parâmetros apresentados na tabela 2. Os trigos das classes Melhorador e Pão são indicados para a fabricação de pães industriais, massas alimentícias secas e biscoitos tipo cracker; os trigos das classes Pão e Doméstico são destinados à produção de pães caseiros e uso doméstico; enquanto os trigos das classes Básico e Outros usos são indicados na produção de biscoitos e bolos. Quanto ao tipo, o trigo pode ser tipo 1, 2, 3 e fora de tipo, considerando limites máximos de tolerância de impurezas, matérias estranhas e defeitos.

Tabela 2. Classes do trigo do Grupo II destinado à moagem e outras finalidades.

Classes	Força do Glúten (Valor mínimo expresso em 10^{-4} J)	Estabilidade (Tempo expresso em minutos)	Número de Queda (Valor mínimo expresso em seg.)
Melhorador	300	14	250
Pão	220	10	220
Doméstico	160	6	220
Básico	100	3	200
Outros usos	Qualquer	Qualquer	Qualquer

Fonte: Instrução Normativa do MAPA nº 38 (BRASIL, 2010)

A IN38 (BRASIL, 2010) estabelece alguns conceitos como: trigo - grãos provenientes das espécies *Triticum aestivum* L e *Triticum durum* L; estabilidade - o tempo, em minutos, que uma massa mantém estável suas características viscoelásticas, quando submetida ao processo de amassamento; força do glúten - o trabalho mecânico necessário para expandir a massa até a sua ruptura, expressa em Joules (J); número de queda (*Falling Number*) - medida indireta da atividade da enzima alfa-amilase, determinada em trigo moído com valor expresso em segundos e peso do hectolitro (ou peso hectolítico) - a massa de 100 (cem) litros de trigo, expressa em quilogramas (kg). Para avaliar a qualidade do grão são usados parâmetros físicos, como peso de mil grãos e peso do hectolitro (PH) bem como parâmetros físico-químicos como número de queda, umidade, teor de proteínas e cinzas.

Para fins de comercialização o peso do hectolitro (PH) é o parâmetro mais utilizado em vários países, pois representa uma avaliação indireta da qualidade dos grãos (COSTA *et al.*, 2008), onde impurezas e grãos malformados influenciam e reduzem a qualidade. Já o peso de mil grãos, é um parâmetro que classifica o trigo pelo seu tamanho. O tamanho excessivo não é bem visto pelas indústrias por impor dificuldades de regulagem de equipamentos de limpeza e moagem e grãos pequenos podem passar pelas peneiras de limpeza, em ambos os casos, gerando perdas (GUTKOSKI *et al.*, 2008). Além se der influenciada pela qualidade do produto, a definição do preço do trigo sofre influência de diversos outros fatores como a frustação da safra por condições climáticas adversas, os preços dos produtos associados (como o milho), a relação cambial e a disponibilidade de trigo nos países vizinhos (Argentina, Uruguai e Paraguai). Para além desses fatores, a inocuidade e a aptidão tecnológica também contribuem para definição do preço do cereal (BORÉM; SCHEEREN, 2015).

Para nomenclatura do trigo, no Brasil, não são utilizados os termos “soft” e “hard” como acontece em outros países. Em geral, na América do Norte essas duas terminologias são usadas para *T. aestivum* e o termo “durum” para *T. turgidum* ssp. *durum*. No entanto, em alguns países da Europa o termo “soft” refere-se ao *T. aestivum* e o termo “hard” ao *T. turgidum* ssp. *durum*. Eles apresentam diferentes textura do endosperma que afetam o uso preferencial da farinha. Em geral, a farinha de trigo mole

(soft) é usada para bolo e biscoito, farinha de trigo duro (*hard*) para pão e sêmola de trigo *durum* para massas (PAULY *et al.*, 2013).

Os parâmetros de qualidade da farinha foram estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de Trigo de que trata a IN nº 08 (BRASIL, 2005). Segundo a IN08, farinha de trigo é um produto elaborado com grãos de trigo (*Triticum aestivum L.*) ou com grãos de outras espécies de trigo do gênero *Triticum*, ou combinações por meio de Trituração ou moagem e outras tecnologias ou processos. A farinha de trigo integral tem as mesmas especificações, mas a partir do processamento completo do grão limpo, contendo ou não o gérmen. As farinhas são, então, classificadas em tipos conforme a tabela 3.

Tabela 3. Limites de tolerâncias para farinhas de trigo.

Tipos	Teor de Cinzas (b.s. máximo)	Granulometria	Teor de Proteínas (b.s.; mín.)	Acidez Graxa (mg de KOH /100g) (máx)	Umidade (máximo)
Tipo 1	0,8	95% produto deve passar em peneira com abertura de malha de 250 µm.	7,5%	100	15%
Tipo 2	1,4		8,0%	100	15%
Integral	2,5	-	8,0%	100	15%

Fonte: Instrução Normativa 08 (BRASIL, 2005). (b.s.) base seca.

A taxa de extração utilizada para moagem dos grãos afeta a composição química da farinha e corresponde ao grau de separação do endosperma e, consequentemente ao rendimento. Assim, uma separação eficiente e limpa do endosperma do farelo durante a moagem é importante para o rendimento e, quanto mais frações da camada aleurona permanece junto ao endosperma, maior é o teor de cinzas da farinha (HEMERY *et al.*, 2007; JI *et al.*, 2020).

1.3 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GRÃO

O trigo é um cereal com inflorescência do tipo espiga, onde as flores crescem ao longo de um eixo. Botanicamente, trigo é uma monocotiledônea por apresentar um só cotilédone na ocasião da germinação (SERNA-SALDIVAR, 2010). Em termos de composição química, os grãos de trigo são compostos por carboidratos (65-75%, representados por amido e fibras), proteínas (7-12%), lipídios (2-6%), água (12-14%) e micronutrientes (HEMERY *et al.*, 2007). O grão de trigo é chamado de cariopse e é essencialmente composto pelo gérmen, envelopes externos (farelo) e endosperma (SURGET; BARRON, 2005) (Figura 2).

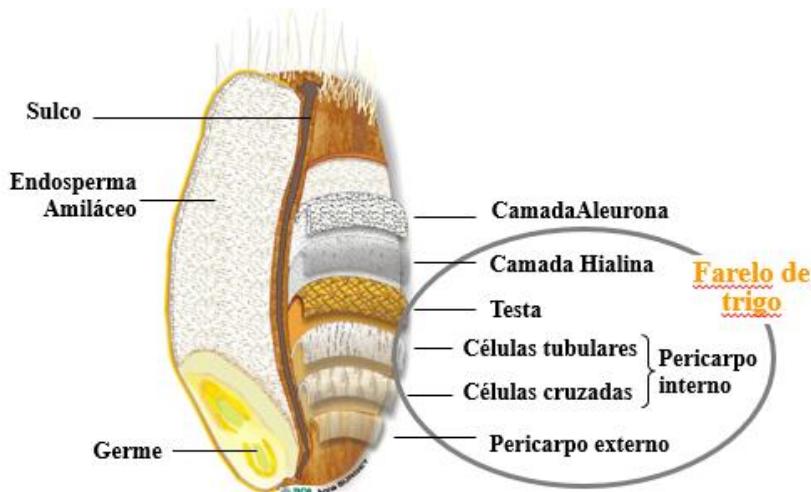


Figura 2. O grão de trigo e suas diferentes camadas. Adaptado de Surget e Barron (2005).

Cada tecido possui uma estrutura e composição diferente: o gérmen (3 % do grão) é rico em lipídeos, vitaminas do complexo B e minerais; os envelopes externos (pericarpo e testa) são ricos em fibras alimentares, e possuem a maior parte das vitaminas, minerais e compostos fenólicos (HEMERY *et al.*, 2007). O endosperma constitui-se da camada aleurona e do endosperma amiláceo. Este último representa cerca de 80-85% do grão, apresentando células repletas de grânulos de amido incorporados em uma matriz proteica, formada essencialmente por proteínas de reserva (SAULNIER, 2012). A camada aleurona compõe cerca de 7 % da massa seca do grão de trigo, contém a maior parte das vitaminas do complexo B e cerca de metade do conteúdo mineral total. Comparada com as camadas mais periféricas, a camada aleurona também possui um alto teor de proteínas e, estas, apresentam melhor equilíbrio de aminoácidos do que o

proteínas do endosperma, principalmente por possuírem níveis mais altos de lisina (HEMERY *et al.*, 2007).

Considerando a composição química, a retirada do gérmen é interessante para a produção de farinha com maior estabilidade no armazenamento, uma vez que a presença de lipídios e de enzimas hidrolíticas e oxidativas do gérmen podem causar rancidez à farinha. Adicionalmente, para moagem dos grãos, pode ser realizado um pré-processamento com retirada das camadas mais externas, de forma a tornar o processo mais eficiente, melhorar a qualidade dos produtos e separar frações de interesse. (HEMERY *et al.*, 2007).

1.4 PROTEÍNAS DO TRIGO E SEU IMPACTO NA APTIDÃO TECNOLÓGICA DO GRÃO

De acordo com a solubilidade, as proteínas do trigo foram classificadas por Osborne (1907) em quatro classes: albuminas solúveis em água, globulinas em soluções salinas, gliadinas em soluções alcoólicas e gluteninas em ácidos ou bases diluídas. Mais tarde, outra classificação foi proposta por Shewry *et al.* (1986), considerando o grau de polimerização (determinado pelas pontes dissulfeto intermoleculares) e o teor de aminoácidos sulfurados das proteínas de reserva, conhecidas genericamente no trigo como prolaminas: as gliadinas são prolaminas monoméricas e as gluteninas são prolaminas poliméricas, constituídas de subunidades de baixa e alta massa molecular, que formam agregados estabilizados por pontes dissulfeto (Figura 3).

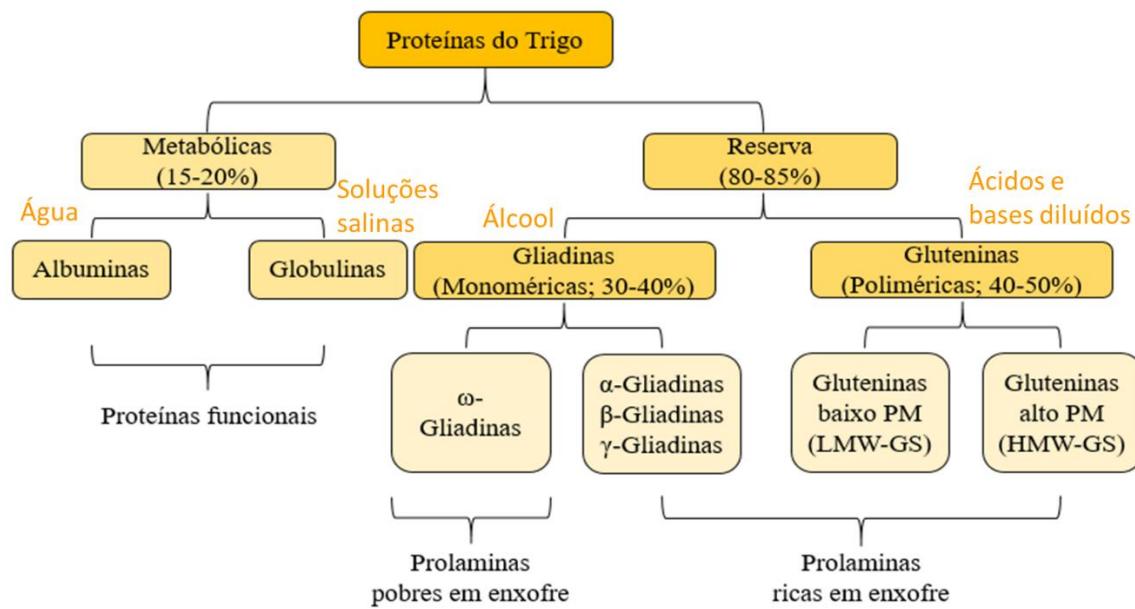


Figura 3. Composição das proteínas do trigo: aproximação entre as classificações de Osborne (1907) e Shewry (1986).

1.4.1 Proteínas metabólicas

As albuminas e globulinas são proteínas metabólicas conhecidas como não-prolaminas e, em cereais, encontram-se no farelo do grão e também nas células da camada aleurona que constituem o endosperma (KHAN *et al.*, 2015). Estas proteínas compreendem de 15 a 20% do total de proteína do grão e são, principalmente enzimas com massa molecular em torno de 25 kDa, podendo variar de 60 a 70 kDa (GOESAERT *et al.*, 2005). Nutricionalmente, são ricas em aminoácidos essenciais como triptofano, metionina e lisina (KHAN *et al.*, 2015).

As albuminas são α -amilases, inibidoras de proteases e outras enzimas com diferentes funções fisiológicas (TOMIĆ *et al.*, 2015). Na avaliação feita por Gao *et al.* (2009), em duas amostras de trigo, a distribuição funcional de A/G mostrou que as proteínas foram mais associadas ao metabolismo de carboidratos (30%), seguido de estresse/defesa (22%), proteínas de reserva (15%) e síntese/montagem/degradação de proteínas (7%). Khan *et al.* (2015) avaliaram a fração albumina de 14 variedades de trigo e verificaram que a massa molecular variou 8 a 72 kDa e suas funções biológicas principais foram relacionadas com a quebra do amido. Victorio *et al.* (2018) avaliaram a fração A/G em amostras de trigo agrupadas por aptidão tecnológica e encontraram a

distribuição nas funções moleculares de ligação (45%), ação enzimática de hidrolases, transferases e óxido redutases (29%), proteínas de ligação iônica (9%), estrutural (4%), transporte (4%) e reguladora (3%).

As puroindolininas, proteínas desta fração, parecem apresentar função biológica de defesa nas plantas. Mas elas são conhecidas por influenciar na textura do endosperma do grão, estando ligadas à base molecular da dureza do trigo (PAULY *et al.*, 2013). PINs são proteínas básicas e ricas em cisteína que aparecem em duas isoformas no trigo, puroindolina A (PINA) e puroindolina B (PINB). (ULLIEN-PELLERIN; MARION, 2002). PINA e PINB possuem 10 resíduos de cisteína. Os genes (*Pina-D1* e *Pinb-D1*) que codificam estas proteínas fazem parte do locus *Ha* do braço curto do cromossomo 5D. Mutações nestes genes resultam em alteração na textura do endosperma. Para o gene *Pina-D1* a mutação mais comum é uma mutação nula (*Pina-D1b*), enquanto para *Pina-D1* existem várias (*Pina-D1b-g*) todas resultando em grãos duros (PAULY *et al.*, 2013).

1.4.2 Proteínas de Reserva

As gliadinas e gluteninas são consideradas proteínas de reserva, pois suas funções são armazenar nutrientes e fornecer nitrogênio durante a germinação das sementes (FEILLET, 2000). Elas são caracterizadas por serem insolúveis em água e por possuírem alto teor de prolina e glutamina (VAN DEN BROECK *et al.*, 2015). Essas proteínas correspondem a 80-85% do conteúdo proteico total do grão e são encontradas principalmente no endosperma amiláceo (GOESAERT *et al.*, 2005). Estão divididas em dois grupos de acordo com sua habilidade em formar polímeros através de pontes dissulfeto intermoleculares entre subunidades proteicas (DAHESH *et al.*, 2014). Estas ligações fazem com que essas proteínas estejam envolvidas com a aptidão tecnológica do trigo (LUTZ *et al.*, 2012). As gliadinas, solúveis em álcool, conferem viscosidade e extensibilidade à massa e as gluteninas, insolúveis em álcool, relacionam-se com força e elasticidade (VENSEL *et al.*, 2014; WIESER, 2007). A insolubilidade em água e a possibilidade de associações covalentes e não-covalentes são propriedades que permitem a essas proteínas serem isoladas como uma massa coesa, o glúten (SHEWRY, 2009), que proporciona viscoelasticidade à massa e boa retenção de gás, o que constitui um importante papel na funcionalidade de panificação (BÉKÉS, 2012).

- GLIADINAS

As gliadinas podem ser divididas em α/β -, γ - e ω -gliadinas (Figura 2), com base na mobilidade em gel de eletroforese. Por possuírem pontes dissulfeto intramoleculares, apresentam-se como monômeros, sendo α/β - e γ -gliadinas encontradas em maiores proporções do que ω 1,2-, ω 5-gliadinas. Este fato está relacionado com o genótipo da variedade e com as condições de crescimento do trigo (WIESER, 2007). Os genes que codificam as gliadinas estão no braço curto dos cromossomos 1 e 6 dos genomas A e B e seus lócus são chamados *Gli-1* e *Gli-2*, respectivamente (JOPPA *et al.*, 1983).

Cada tipo de gliadina tem como característica dois domínios diferentes: o N-terminal com sequências repetitivas ricas nos aminoácidos glutamina, prolina, fenilalanina e tirosina e o C-terminal que não é repetitivo e contém as cisteínas (WIESER, 2007). Em geral, α -gliadinas contêm seis resíduos de cisteínas e γ -gliadinas possuem oito podendo fazer, respectivamente, três e quatro ligações intramoleculares (Figura 4), enquanto ω -gliadinas não possuem cisteínas (LUTZ *et al.*, 2012).

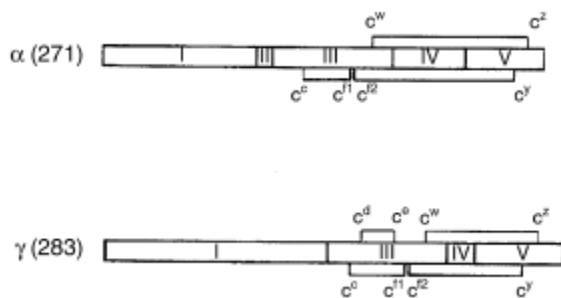


Figura 4. Estruturas das α - e γ -gliadinas com ligações dissulfeto intramoleculares apresentadas por Wieser (2007).

Apesar da separação das gliadinas como monômeros e gluteninas como polímeros, algumas gliadinas contém número ímpar de cisteínas decorrentes de mutações de aminoácido pontuais (LUTZ *et al.*, 2012). As cisteínas livres fazem com que essas gliadinas também sejam capazes de formar pontes dissulfeto intermoleculares, agindo como terminadores de cadeia. Elas têm estrutura de gliadina, mas funcionam como gluteninas (MUCCILLI *et al.*, 2010; VENSEL *et al.*, 2014).

- GLUTENINAS

As gluteninas são divididas em subunidades de alta massa molecular (*High-molecular-weight glutenin subunits* - HMW-GS) e de baixa massa molecular (*Low-molecular-weight glutenin subunits* - LMW-GS). Apresentam-se como polímeros porque possuem cisteínas livres que possuem grupamentos tióis (SH), podendo fazer, adicionalmente, pontes dissulfeto intermoleculares (MUCCILLI *et al.*, 2010; ROMBOUTS *et al.*, 2013; VENSEL *et al.*, 2014). Devido à natureza polimérica, a massa molecular das gluteninas pode variar de 500.000 a mais de 10 milhões de Dalton (Da) (LUTZ *et al.*, 2012; WIESER, 2007; WRIGLEY, 1996), tornando-as insolúveis mesmo em tampões desnaturantes como o dodecil sulfato de sódio (SDS), necessitando de redução e sonicação para solubilização (VENSEL *et al.*, 2014).

Assim como as gliadinas, as LMW-GS, possuem um domínio N-terminal repetitivo rico em prolina e glutamina e um C-terminal não repetitivo homólogo ao das α/β -, γ -gliadinas (WIESER, 2007). As LMW-GS contêm seis resíduos de cisteína em posições homólogas às de α/β -, γ -gliadinas, com três ligações intramoleculares, e dois resíduos adicionais responsáveis pelas ligações intermoleculares (LUTZ *et al.*, 2012; MUCCILLI *et al.*, 2010). Estas subunidades de glutenina podem ser classificadas como extensoras ou terminadoras de polímeros (MUCCILLI *et al.*, 2010) (Figura 5) e são codificadas por genes localizados no braço curto dos cromossomos 1 dos genomas A, B e D, cujos lócus são *Glu-A3*, *Glu-B3* e *Glu-D3* (LEW *et al.*, 1992).

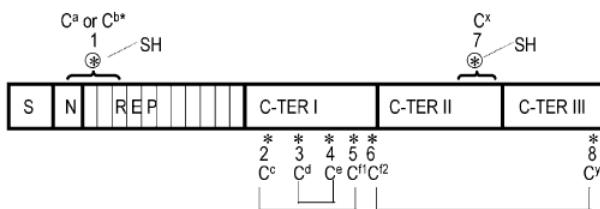


Figura 5. Esquema proposto para as estruturas típicas de LMW-GS por D'ovidio & Masci (2004). As cisteínas são designadas por números ou de acordo com o sistema de letras proposto por Kohler *et al.*(1993). SH ou asterisco representam as cisteínas que formam pontes dissulfeto intermolecular. S, peptídeo sinal, N, N-terminal, REP, domínio repetitivo e C-TER, domínios C-terminal.

As HMW-GS são codificadas por genes do braço longo dos genomas A, B e D. Seus lócus são chamados *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1* (LEW *et al.*, 1992; SHEWRY; HALFORD, 2002). Elas podem ser do tipo x (x- HMW-GS) ou do tipo y (y-HMW-GS), sendo as do

tipo-x as que possuem maior massa molecular relativa ($83.000 < Mr < 88.000$) comparada com as do tipo-y ($67.000 < Mr < 74.000$). Estruturalmente, as HMW-GS possuem dois domínios não repetitivos, denominados N- e C- terminais separados por um domínio central repetitivo (SHEWRY; TATHAM, 1990). Muitas variedades de trigo possuem quatro ou cinco HMW-GS, quando possuem quatro, duas são do tipo x e duas do tipo y e quando possuem cinco, três são do tipo x e duas são do tipo y (KASARDA, 1989). As x-HMW-GS possuem quatro ou cinco cisteínas, diferindo das y-HMW-GS que possuem sete (LUTZ *et al.*, 2012).

1.4.3 Impacto das proteínas metabólicas e de reserva na aptidão tecnológica do grão de trigo

A maior parte dos cereais é consumida em alimentos processados e, por isso, o impacto de suas proteínas nas propriedades funcionais do processamento de alimentos deve ser considerado (SHEWRY; HALFORD, 2002). No caso do trigo, o conteúdo proteico, inclusive, exerce forte influência na determinação do preço do cereal baseado no argumento de que mais proteína proporciona maior qualidade de cozimento, por exemplo, maior volume de pão (LANGENKÄMPER; ZÖRB, 2019). As propriedades únicas da massa feita com a farinha que permitem que o trigo seja processado em inúmeros produtos de panificação (BÉKÉS, 2012; SHEWRY, 2009) constituem uma vantagem do uso do cereal sobre as outras culturas (SHEWRY, 2009).

No que tange a função das proteínas metabólicas que pode impactar na aptidão tecnológica do trigo, estudos mostram que chaperonas e isomerases estão relacionadas ao enovelamento adequado das proteínas de reserva sintetizadas no retículo endoplasmático (KIMURA *et al.*, 2015; OSIPOVA *et al.*, 2012). A glicoproteína PDI, pertencente à família da tiorredoxina, possui massa molecular de 60 kDa (OSIPOVA *et al.*, 2012) e atua assegurando que o enovelamento tridimensional e as pontes dissulfeto ocorram corretamente (DONG *et al.*, 2012; OSIPOVA *et al.*, 2012), podendo dar origem a polímeros de glutenina regulares, culminando em maior qualidade do glúten (LIU *et al.*, 2012). Proteínas da família de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSPs), como HSP60, HSP70, HSP90, realizam atividades de reenovelamento de proteínas de forma dependente de adenosina trifosfato (ATP), enquanto *small* HSPs ligam-se e

sequestram proteínas com enovelamento incorreto de forma independente de ATP. *Small HSPs* não exibem atividade de reenovelamento e degradação e atuam de forma distinta das outras chaperonas por impedirem que proteínas mal enoveladas formem grandes e insolúveis agregados proteicos (MOGK *et al.*, 2019). Outra proteína dessa fração, calreticulina, atua como ligante de Ca²⁺ no enovelamento proteico (JIA *et al.*, 2008), cooperando com HSP70 e PDI no síntese de proteínas do glúten no retículo endoplasmático (LV *et al.*, 2021).

Adicionalmente, já foi demonstrado que puroindolininas também interagem com as proteínas do glúten, afetando o comportamento de agregação de gliadinas em solução (GENEIX *et al.*, 2020) e que, na ausência de PINA, houve aumento do tamanho dos polímeros de proteínas de reserva (LESAGE *et al.*, 2012). Sabe-se que, juntas, PINA e PINB afetam a maciez do grão de trigo e, consequentemente, o rendimento da moagem, o rendimento de quebra da farinha e o amido danificado (HEINZE *et al.*, 2016; LULLIEN-PELLERIN, 2020). Quando ambas estão presentes, o grão apresenta fenótipo mole e, neste caso, há uma redução na resistência mecânica do grão (LULLIEN-PELLERIN, 2020; MA *et al.*, 2020). Na ausência de PINA (*alelo Pina nulo*) o grão apresenta fenótipo duro (LESAGE *et al.*, 2012; PAULY *et al.*, 2013), enquanto que, quando há super expressão do alelo *Pina-D1a* há uma redução significativa na dureza do grão (GENEIX *et al.*, 2020).

PINs também influenciam na porosidade do endosperma e, consequentemente, diminuindo a vitreosidade. A vitreosidade é uma propriedade física relacionada ao rendimento da quebra da farinha na moagem, quanto maior a vitreosidade, maior a energia necessária para quebrar os grãos. Grãos portadores de genes PIN do tipo selvagem (*Pina-D1a* e *Pinb-D1a*) apresentam menor vitreosidade, enquanto valores mais altos estão associados ao alelo com mutação *Pinb-D1b* ou *Pinb-D1d* (LULLIEN-PELLERIN, 2020). Assim, a transformação em variantes do alelo *Pinb* pode ser considerada uma importante estratégia para o melhoramento de trigo (MA *et al.*, 2020).

No sentido da relação entre as proteínas de reserva e a aptidão tecnológica da farinha, a quantidade e a distribuição da massa molecular dos polímeros de glutenina foram há tempos correlacionados com a qualidade em testes tecnológicos e de panificação (PAYNE *et al.*, 1987). Combinando resultados de abordagens genéticas (que

estudam o polimorfismo das proteínas do glúten e formas alélicas e seus aspectos na qualidade de processamento) e de abordagens bioquímicas e biofísicas (que mostram a capacidade de formar complexos poliméricos), a importância das HMW-GS foi evidenciado (SHEWRY, 2009). Sabe-se que muitos estudos têm como foco essas proteínas (BARAK *et al.*, 2013), mas cabe ressaltar que uma mistura apropriada das frações de gliadina e glutenina é essencial para as propriedades viscoelásticas da massa e qualidade do produto final (WIESER, 2007). Barak *et al.* (2013) mostraram que variedades de trigo com composição semelhante em HMW-GS, mas que possuíam razão gliadina/glutenina diferentes, apresentaram propriedade reológicas diferentes.

Está bem estabelecido que genótipos de aptidão tecnológica superior são associados a não somente um alto teor de HMW-GS, mas principalmente com o tipo de subunidade codificada pelos cromossomos, são elas a subunidade 1Ax e o par de subunidades 1Dx5+1Dy10 codificadas pelo cromossomo 1D, quando comparadas com outras subunidades alélicas, tais como as 1Dx2+1Dy12, 1Dx3+1Dy12 e 1Dx4+1Dy12 (SHEWRY; HALFORD, 2002). Segundo Costa *et al.* (2013), em programas de melhoramento genético, as HMW-GS do alelo 1 (Glu-A1) e alelo 5 + 10 (Glu-D1), assim como as LMW-GS do alelo c (Glu-A3) e alelo b (Glu-B3) são preferidas para o desenvolvimento de variedades com força do glúten e extensibilidade adequadas para produtos assados. Outro estudo apontou que as subunidade de HMW-GS que mais influenciaram na aptidão tecnológica das amostras de trigo foram Dy10, Dy3 e Dx5, enquanto HMW-GS 1Bx17 e LMW-GS foram as subunidade que mais influenciaram a qualidade do pão (AGHAGHOLIZADEH *et al.*, 2017).

Assim, percebe-se que há cada vez maior necessidade de entendimento da fração de proteínas do trigo para melhor entendimento da influência que exercem na aptidão tecnológica do trigo. Cabe ressaltar que todo o estudo a ser realizado, está ainda mais acessível com o progresso das ferramentas proteômicas (LIU *et al.*, 2012)

CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE TRIGO E DE OUTROS CEREAIS POR ABORDAGEM PROTEÔMICA

- 2.1 Desafios para análise proteômica do trigo
 - 2.2 Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas
 - 2.3 Estratégias e métodos em espectrometria de massas
 - 2.4 Abordagem proteômica em trigo e outros cereais
-

2 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE TRIGO E DE OUTROS CEREAIS POR ABORDAGEM PROTEÔMICA

2.1 DESAFIOS PARA ANÁLISE PROTEÔMICA DO TRIGO

O fracionamento baseado na solubilidade das proteínas do trigo, proposto por Osborne (1907), foi o ponto de partida para análise destas proteínas. Esta divisão apresenta desvantagens como a sobreposição entre as frações de proteínas e o conteúdo de proteínas que permanece sem extração, por isso, estabelecer e melhorar técnicas de extração é o primeiro grande desafio em abordagens proteômicas (LANGENKÄMPER; ZÖRB, 2019), uma vez que o método influencia os resultados (XHAFERAJ *et al.*, 2020). Como tentativa de superar os problemas de fracionamento, tem sido proposto o desenvolvimento de métodos que utilizem apenas uma solução para extrair o maior número de proteínas de grãos, como por exemplo, a utilização de solução à base de SDS ou o uso de ácido tricloroacético em acetona gelada (LANGENKÄMPER; ZÖRB, 2019). Sabe-se que, dependendo do protocolo utilizado, diferentes classes de proteínas podem ser extraídas (XHAFERAJ *et al.*, 2020) e que a escolha de qual método será utilizado depende de questões individuais inerentes aos objetivos da pesquisa a ser realizada. Assim, quando se busca por proteínas menos abundantes, pode ser necessário utilizar uma técnica de extração mais específica (LANGENKÄMPER; ZÖRB, 2019).

No que tange a extração das proteínas do glúten, para separar as gliadinas das gluteninas é necessário utilizar um solvente capaz de romper ligações de hidrogênio,

como ureia, mas para separar os polímeros de glutenina em unidades individuais é necessário o uso de agentes redutores, como 2-mercaptopropano ou ditiotreitol (em inglês, Dithiothreitol, DTT) (SHEWRY, 2009). Por possuírem muitas ligações covalentes, para solubilizar os polímeros de glutenina de maior tamanho, pode ser necessária a utilização de ultrassom (sonicação) (ALTENBACH *et al.*, 2016). No entanto, mesmo protocolos em várias etapas não alcançaram resultados efetivos na separação destas proteínas, como no caso de utilização de extração em dois passos utilizando 2-propano e DTT (XHAFERAJ *et al.*, 2020).

Para a etapa de digestão, as principais enzimas utilizadas em análises proteômicas são tripsina e quimotripsina. A primeira é específica para clivagem C-terminal de resíduos de lisina e arginina e a segunda é menos específica e cliva, em nível C-terminal, tirosina, fenilalanina, triptofano e leucina, somente se não estiverem antes de resíduos de prolina (FIEDLER *et al.*, 2014). Sabe-se que as proteínas de reserva do trigo possuem baixo número de resíduos básicos, além de serem ricas em prolinas (P) e glutaminas (Q) e apresentarem sequências repetidas (PxQ) que são altamente complexas podendo tornar a digestão ineficiente com produção de peptídeos grandes que são mais difíceis de identificação por MS (AGHAGHOLIZADEH *et al.*, 2017; CLAVIJO *et al.*, 2017; VENSEL *et al.*, 2011). Uma alternativa para melhorar a digestão das proteínas de reserva do trigo, é a utilização de tripsina/Lys-C que possui maior eficiência do que a tripsina na clivagem em sítios de lisina e já foi relatado maior quantidade de peptídeos identificados após digestão com tripsina/Lys-C do que com quimotripsina em análise das proteínas do trigo (VINCENT *et al.*, 2022).

Passando para a etapa de identificação, esforços foram executados na construção de banco de dados visando melhorar a análise das proteínas do trigo. O primeiro banco de dados de sequências de proteínas de glúten de trigo de código aberto com curadoria manual foi criado por Bromillow *et al.* (2017a) e inclui 630 sequências discretas de proteínas. Trata-se do GluPro V1.0 que possui formato FASTA permitindo aplicação de métodos proteômicos para detecção e quantificação de proteínas do glúten. Adicionalmente, Clavijo *et al.* (2017) identificaram 105 genes de glúten completos ou parciais que permitiram a anotação adicional de 33 genes e a correção manual de 21 modelos de genes. Em 2018, foi lançada a referência de genoma do trigo, RefSeq v.1.0,

pelo Consórcio Internacional de Sequenciamento do Genoma do Trigo (*International Wheat Genome Sequencing Consortium*, IWGSC) que conta com acesso completo à sequência ordenada de todos os 21 cromossomos de trigo (IWGSC *et al.*, 2018). O RefSeq v.1.0 foi então, utilizado como genoma de referência para a criação do *WheatGmap*, que conta com mais de 3500 informações sobre o sequenciamento de trigo hexaploide, incluindo o sequenciamento do genoma inteiro, de exoma inteiro e transcriptoma (ZHANG *et al.*, 2021). A montagem completa e robusta do genoma do trigo é fundamental para o processo de melhoramento do cereal (CLAVIJO *et al.*, 2017).

Considerando que a identificação de proteínas por espectrometria de massas é dificultada pela alta similaridade entre as sequências primárias das subunidades das proteínas de reserva do trigo e pelo alto número de isoformas (LANGENKÄMPER; ZÖRB, 2019), a publicação do genoma de referência totalmente anotado contribuirá para superar os limites na pesquisa, principalmente quando aplicadas abordagens proteômicas. Abordagens proteômicas com base em técnicas que utilizam cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HDMS) capazes de separar até mesmo peptídeos de mesma *m/z* (i.e. sistema de mobilidade iônica) e métodos de análise independentes de dados (DIA), revelam-se como importantes ferramentas para a identificação e a quantificação das proteínas do trigo.

2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

De maneira breve, a cromatografia líquida é uma técnica de separação de componentes de uma amostra por meio de uma interação diferencial desses componentes entre uma fase móvel (solventes) e uma fase estacionária (coluna). Em comparação à cromatografia líquida de alta performance (HPLC), a cromatografia líquida de ultra performance (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC), possui capacidade de trabalho em altas pressões (acima de 100 MPa - 15000 psi) devido ao tipo e colunas utilizadas. Além disso, na UPLC o tamanho das partículas que compõem as colunas é menor (<2 µm). Os cromatogramas obtidos por UPLC apresentam melhor resolução e separação e maior sensibilidade, além do menor tempo de análise e consumo de solvente (MALDANER; JARDIM, 2009; TALEUZZAMAN *et al.*, 2015).

A espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*, MS) é uma técnica analítica utilizada para a identificação e quantificação de espécies químicas em suas formas ionizadas, através da medição de suas razões massa/carga em fase gasosa (*m/z*). Esta ferramenta tem se tornado cada vez mais útil no estudo de sistemas biológicos complexos, e tem ajudado na identificação, quantificação e mapeamento de importantes moléculas funcionais (AEBERSOLD; MANN, 2016; KRUVE *et al.*, 2015). A MS é uma ferramenta essencial para análises proteômicas em larga escala (DISTLER *et al.*, 2014) e, por ser uma técnica capaz de fornecer informações moleculares específicas, tais como identificação da sequência de peptídeos, vem sendo utilizada para identificar e distinguir proteínas oriundas de diferentes cereais (FIEDLER *et al.*, 2014).

As duas técnicas acopladas LC-MS, têm sido utilizadas com sucesso em análises proteômicas não direcionadas que almejam caracterizar o proteoma e subproteoma (ex. proteínas metabólicas) do trigo (AFZAL *et al.*, 2021; VICTORIO *et al.*, 2018). É importante ressaltar que etapas precedentes à análise precisam ser realizadas (ALVES *et al.*, 2017). De maneira geral, essas etapas compreendem redução e alquilação dos extratos proteicos, que objetivam facilitar o processo de digestão por meio da clivagem das pontes dissulfeto e alquilação dos grupamentos tióis. A tripsina é a protease mais comumente utilizada para digestão de proteínas e costuma gerar peptídeos em uma faixa de massa de 500 a 3.000 Da, facilitando a separação cromatográfica. Além disso, os peptídeos trípticos possuem boa ionização e fragmentação devido à presença de resíduos C-terminais de lisina ou arginina que são protonados de forma eficiente em condições ácidas (GILLET *et al.*, 2016). No entanto, para digerir as proteínas de reserva do trigo, outras enzimas têm sido preferencialmente utilizadas para resolver o problema da falta de sítios de clivagem trípticos (ex: lisina), são elas a tripsina/Lys-C (VINCENT *et al.*, 2022), a termolisina e a quimotripsina (VENSEL *et al.*, 2011). Assim, a escolha da enzima, dos reagentes redutores e alquilantes é muito importante e têm sido associada a uma melhora na identificação das proteínas do glúten, pois permitem uma melhor distinção entre as proteínas homólogas (DUPONT *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2014; ROMBOUTS *et al.*, 2013).

2.3 ESTRATÉGIAS E MÉTODOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Em proteômica do tipo *shotgun*, também conhecida como *bottom-up*, as proteínas são digeridas em peptídeos pela ação de enzimas proteolíticas e a massa espetrométrica dos peptídeos é mensurada (GILLET *et al.*, 2016). Para análise livre de gel, os peptídeos são analisados por cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), em geral, utilizando aquisição dependente de dados (data-dependent acquisition, DDA) onde há a seleção dos íons precursores mais intensos com base na abundância relativa e estes são fragmentados em série. Esse tipo de método possui limitações como seleção de íons irreproduzíveis, sub-amostragem e longo ciclo instrumental (DISTLER *et al.*, 2014).

Visando diminuir os problemas supracitados, espetrômetros de massas mais recentes possuem maior resolução e velocidade de sequenciamento, além de ter precisão de massa melhorada. Adicionalmente, estratégias imparciais de aquisição denominadas independente de dados (*data-independent acquisition*, DIA) também foram criadas para superar as limitações do DDA, fazendo fragmentação simultânea de múltiplos íons precursores sem considerar intensidade ou outra característica, permitindo obtenção de resultados mais abrangentes (SOUZA *et al.*, 2017). Em métodos com a estratégia DIA, todos os íons gerados na fonte são transmitidos até a célula de colisão, que alterna entre baixa e alta energia, enviando alternadamente precursores e fragmentos ao analisador. Os resultados desses métodos são abrangentes e reproduzíveis porque ocorre a fragmentação simultânea de múltiplos íons precursores, independentemente da intensidade ou de outra característica. Dessa forma, são obtidos dados de massa exata de precursores e fragmentos ao mesmo tempo, tornando-os ideais para análise de amostras complexas por permitirem ampla cobertura de faixa dinâmica (DISTLER *et al.*, 2014; DISTLER *et al.*, 2016; GEROMANOS *et al.*, 2009).

Esses métodos que alternam entre duas condições de energia de colisão são denominados MS^E. Neles, os dados LC-MS são coletados em todo o experimento e o alinhamento baseia-se no fato de que o perfil cromatográfico dos íons precursores é semelhante aos dos seus íons precursores (GEROMANOS *et al.*, 2009). O método de alta definição denominado *High Definition MS^E* (HDMS^E) é um método MS^E acrescido do sistema de espetrometria por mobilidade iônica (*Ion Mobility Spectrometry*, IMS) que

permite que os íons dos peptídeos sejam separados pela sua conformação ao passarem por uma fase gasosa, sendo o tempo de aceleração proporcional e dependente da mobilidade através do gás. Essa dimensão adicional de separação reduz interferências e melhora a capacidade máxima do sistema, aumentando a seletividade do alinhamento dos precursores com seus produtos, pois a fragmentação ocorre depois do sistema IMS (DISTLER *et al.*, 2014; DISTLER *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017).

O método conhecido como *Ultra Definition MS^E* (UMDS^E) é um método otimizado no qual a energia de colisão é específica para o tempo de aceleração, pois há uma rampa de energia de colisão de acordo com os dados obtidos na IMS. Dessa forma, a eficiência de fragmentação é melhorada, aumentando a intensidade de desempenho MS/MS para sequenciamento de peptídeos (DISTLER *et al.*, 2014; DISTLER *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017). Por exemplo, Distler *et al.*(2014), demonstraram que o uso de UDMS^E melhorou a eficiência de fragmentação em 105% em comparação com métodos sem mobilidade iônica. O método foi utilizado recentemente para análise da fração A/G do trigo revelando ampla faixa dinâmica ($\log_{10}>5$), identificação de 5.894 proteínas (considerando todas as amostras) e média de 8 peptídeos/proteínas (VICTORIO *et al.*, 2018).

2.4 ABORDAGEM PROTEÔMICA EM TRIGO E OUTROS CEREAIS

A espectrometria de massas tem sido utilizada com sucesso para análise de proteínas de cereais. Nesta seção serão apresentadas informações sobre os três cereais mais produzidos e consumidos no Brasil: milho, arroz e trigo. Recentemente, uma abordagem proteômica comparativa foi realizada para avaliação do milho brasileiro. Técnicas complementares de eletroforese bidimensional e proteômica *bottom-up* (livre de gel) usando NanoUPLC-MS/MS foram utilizadas para a identificação das proteínas diferencialmente abundantes (*differentially abundant proteins*, DAP) envolvidas em diferentes vias metabólicas. Os resultados mostraram diferentes perfis proteicos entre as cultivares de milho biofortificado (que apresenta proteínas de melhor qualidade em termos de aminoácidos essenciais) e a amostra híbrida comercial. Estes resultados podem auxiliar em estratégias de melhoramento genético para cultivares de milho com melhor desempenho nutricional e agronômico (DOS SANTOS-DONADO *et al.*, 2021).

Análise por LC-MS/MS também foi aplicada para análise de grãos de milho imaturos em avaliação de proteínas com determinada modificação pós-traducional (ubiquitinação). Após a identificação de proteínas ubiquitinadas, a classificação por ontologia genética e a análise de enriquecimento de vias foram realizadas e os resultados podem servir de base para compreensão dos papéis fisiológicos das proteínas, além de fornecer informação de como o sistema de ubiquitinação regula o desenvolvimento de grãos de milho (FAN *et al.*, 2021). Ainda, a análise proteômica por métodos DIA em grãos de milho revelou que as alterações no proteoma causadas pelo estresse hídrico foram altamente correlacionadas com o desenvolvimento do grão e acúmulo de amido que se relaciona com o rendimento e qualidade do milho (GUO *et al.*, 2021). Adicionalmente, a comparação do proteoma de milho híbrido com linhas parentais por LC-MS/MS permitiu uma visão ampla da diversidade de proteínas, revelando maior diversidade na amostra híbrida. De fato, a classificação ontológica e a identificação de vias metabólicas são ferramentas que podem ajudar a traçar com clareza os processos realizados por sementes e plantas em sua adaptação e sobrevivência (OSAWA-MARTÍNEZ *et al.*, 2021).

Para análise de arroz, LC-MS/MS foi aplicada em folhas de duas linhagens quase-isogênicas, obtidas da Embrapa Arroz e Feijão, para comparação do perfil proteico de amostras apresentando fenótipo resistente ou suscetível à *Magnaporthe oryzae*. A determinação de DAP e a classificação por ontologia genética mostraram que os perfis proteicos foram notavelmente diferentes durante a infecção inicial, demonstrando singularidades na regulação do proteoma entre as duas linhagens (suscetível e resistente), que podem ser usadas em programas de melhoramento genético com desenvolvimento de culturas mais resistentes a patógenos (TÁVORA *et al.*, 2021). Estudos proteômicos têm sido também realizados, a partir dos grãos, para avaliar alterações proteicas durante o armazenamento (ZHAO *et al.*, 2021), ou ainda como no caso da aplicação de proteômica comparativa para avaliar o efeito da germinação e do enriquecimento com selênio na qualidade do arroz marrom (LI *et al.*, 2018a). O uso de tecnologias de irrigação no processo de enchimento do grão de arroz (LI *et al.*, 2018b) ou da luminosidade e expressão genética na resistência ao estresse (LIU *et al.*, 2020) também têm sido avaliados por técnicas proteômicas por LC-MS/MS. No campo da

qualidade tecnológica, além dos parâmetros de sabor e propriedades físico-químicas do arroz cozido (qualidade culinária), amostras de arroz de diferentes qualidades foram avaliadas por ferramentas proteômicas para estudo do efeito de altas temperaturas sob a expressão de proteínas durante o desenvolvimento da cariopse (LIN *et al.*, 2005) e acompanhamento do perfil proteico do endosperma de sementes em diferentes dias após a floração (KIM *et al.*, 2009).

A aplicação de análises proteômicas em trigo tem sido realizada amplamente para avaliar as alterações no proteoma da planta que vão desde o estudo da fertilização com nitrogênio (LANDOLFI *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2021) ou do estresse hídrico (MEHRI *et al.*, 2020), até a busca por contaminação de trigo em outros grãos e detecção de glúten em alimentos (COLGRAVE *et al.*, 2015; FIEDLER *et al.*, 2014). Considerando a alergenicidade do trigo e a aptidão tecnológica do grão, foi realizado em estudo proteômico com ambas as frações proteicas do trigo (prolaminas e não-prolaminas), revelando que amostras com menor força do glúten apresentaram maior expressão de peptídeos e proteínas relacionados com a doença celíaca (DC) e outras alergias, bem como maior quantidade de epítópos associados a DC do que amostras com mais alta força do glúten (ALVES *et al.*, 2018). Avaliando grãos em desenvolvimento, outro estudo com alvo no proteoma de cultivares com força de glúten contrastantes, revelou maior abundância de precursor de triticina e LMW-s GS na cultivar com maior força de glúten (GUO *et al.*, 2012).

Analizando subproteomas do trigo por LC-MS/MS, foram realizados estudos focados nas proteínas do glúten para entendimento da formação de polímeros (FERREIRA *et al.*, 2014), das modificações do perfil proteico ao longo do desenvolvimento dos grãos (LIU *et al.*, 2012), além de trabalhos voltados a alergenicidade que analisaram epítópos relacionados com a DC ou ainda quantificaram o glúten usando material de referência (SCHALK *et al.*, 2018; VAN DEN BROECK *et al.*, 2015). Em termos de aptidão tecnológica, a caracterização das proteínas do glúten revelou que a amostra de maior força do glúten apresentou maior razão glutenina:gliadina do que a amostra com força de glúten contrastante. Além disso, a razão HMW:LMW-GS foi maior em cultivares com melhores parâmetros químicos e farinográficos (AGHAGHOLIZADEH *et al.*, 2017).

As proteínas metabólicas (fração A/G) foram abordadas para o entendimento de alterações causadas pelo estresse térmico (HURKMAN *et al.*, 2009; LAINO *et al.*, 2010), de possíveis consequências funcionais dos diferentes perfis proteicos ao longo do desenvolvimento dos grãos (ARENA *et al.*, 2017; DONG *et al.*, 2012), almejando caracterizar proteínas específicas dessa fração, como ALPs (ZHANG *et al.*, 2020), para busca de alérgenos (ALVES *et al.*, 2018; LARRE *et al.*, 2011) e para analisar amostras com aptidão tecnológica contrastantes (GAO *et al.*, 2009; VICTORIO *et al.*, 2018). Apesar da relação destas proteínas com a qualidade tecnológica do trigo ser menos reportada na literatura, estes trabalhos mostram que proteínas metabólicas são diferencialmente expressas em farinhas de diferentes aptidões tecnológicas.

A seguir, são apresentados os trabalhos desenvolvidos nesta tese para contribuição no campo de pesquisa da aptidão tecnológica do trigo.

PARTE II

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

CAPÍTULO 3. NANOUPLC-MS^E REVEALS DIFFERENTIAL ABUNDANCE OF GLUTEN PROTEINS IN WHEAT FLOURS OF DIFFERENT TECHNOLOGICAL QUALITIES

CAPÍTULO 4. UNTARGETED PROTEOMICS UNRAVELS THE PROTEIN PROFILE OF WHEAT FLOURS OF CONTRASTING TRAITS BASED ON GLUTEN-FORCE AND NEAR-ISOGENIC LINES DIFFERING BY *PINB-D1* ALLELE

CAPÍTULO 5. COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADOS PARA MELHOR CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO TRIGO: HDMS^E X UDMS^E

CAPÍTULO 3 – NANOUPLC-MS^E REVEALS DIFFERENTIAL ABUNDANCE OF GLUTEN PROTEINS IN WHEAT FLOURS OF DIFFERENT TECHNOLOGICAL QUALITIES

V.C.M. VICTORIO^a T.O. ALVES^a G.H.M. F. SOUZA^{b1} L.C.GUTKOSKI^a L.C.CAMERON^c
M.S. L. FERREIRA^{ac*}

^aLaboratory of Bioactives, Food and Nutrition Graduate Program, PPGAN, Federal University of the State of Rio de Janeiro, UNIRIO, Av. Pasteur, 296, 22290-240, RJ, Brazil. ^bWaters Corporation, Waters, São Paulo, Brazil. ^cCenter of Innovation in Mass Spectrometry-Laboratory of Protein Biochemistry (IMasS-LBP), UNIRIO, Brazil. ¹Current address: Mass Spectrometry Applications & Development, SpectraMass Ltd., Campinas, São Paulo 13088-130, Brazil. *Corresponding author.

Journal of proteomics, 239 (2021). Received 23 November 2020, Revised 18 February 2021, Accepted 28 February 2021, Available online 4 March 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104181>
(FI: 4.044; Qualis único CAPES A1)

HIGHLIGHTS

Gluten proteins of wheat were characterized by a nanoUPLC-MS^E method.

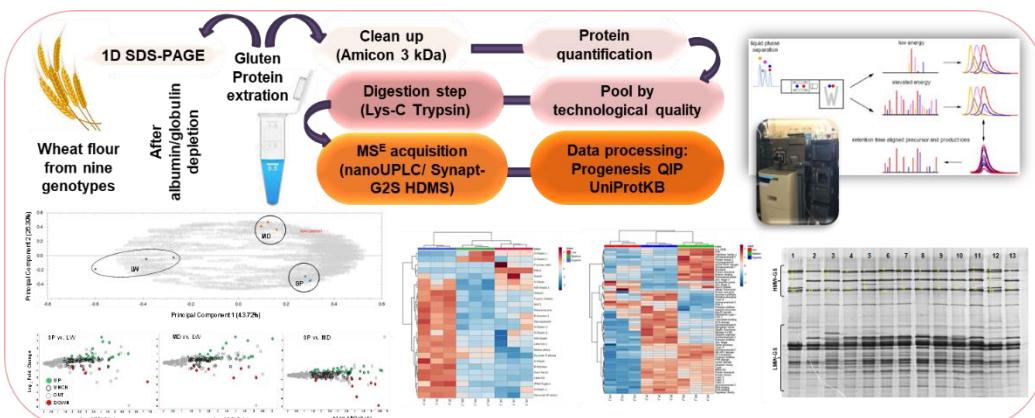
Wheat flours grouped by technological quality present different protein abundance.

Functional domains cluster grouped flours of the highest technological quality.

PCA distinguished groups of different technological qualities.

PCA data are in line with protein abundance profile.

GRAPHICAL ABSTRACT



Graphical abstract 1. Summary of NanoUPLC-MS^E analysis of wheat flour.

ABSTRACT

Gluten proteins contribute to the rheological properties of dough. Mass spectrometric techniques help to understand the contribution of these proteins to the quality of the end product. This work aimed to apply modern proteomic techniques to characterize and provide a better understanding of gluten proteins in different wheat genotypes (*Triticum aestivum*). Nine Brazilian wheat flours classified by rheological gluten force were used to extract the proteins. Extracts were pooled together by technological qualities in low (LW), medium (MD), and superior (SP). Peptides were analyzed by nanoUPLC and mass spectrometry multiplex method (MS^E). Collectively, 3,545 peptides and 1,297 proteins were identified, and 116 proteins were found differentially abundant. Low molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) were found up-regulated only in SP samples. Proteins related to wheat grain hardness, such as puroindoline-A, were found in significant concentration in LW samples. After domain prediction, LW presented a different pattern with a lower abundance of functional domains, and SP presented chaperones, known to be involved in adequate folding of the storage proteins. NanoUPLC-MS^E was efficient in analysing and distinguishing the proteomic pattern of wheat flours from different qualities, pointing out the differentially abundant gluten proteins and providing a better understanding of wheat flour quality.

Keywords: foodomics; protein abundance profile; SDS-PAGE; storage proteins; wheat quality.

Significance: Common wheat is one of the most important staple food sources in the world. The improvement and comprehension of wheat quality has been a major objective of plant breeders and cereal chemists. Our findings highlighted the application of a modern proteomic approach to obtain a better understanding of the impact of gluten proteins on the technological quality of different wheat flours. The obtained data revealed different abundances of wheat quality-related proteins in superior quality flours when compared with samples of low rheological properties. In addition, multivariate statistical analysis clearly distinguished the flours of different qualities. This work contributes to the consolidation of research in the field of wheat technological quality.

1 INTRODUCTION

Gluten is a polymeric network formed after the addition of water and mechanical force in cereals as wheat, barley and rye. In wheat, it is composed of proteins named gliadins and glutenins (WIESER, 2007). Gliadins are monomeric alcohol-soluble proteins stabilized by intramolecular disulphide bonds. Glutenins are polymeric alcohol-insoluble proteins, capable of forming additional intermolecular disulphide bonds. These polymers are formed by monomeric subunits, divided into two categories based on its molecular weight: low and high molecular weight glutenin subunits (LMW and HMW-GS) (SCHERF *et al.*, 2015; WIESER, 2007; WRIGLEY, 1996). These proteins are also called storage proteins and comprise 80 to 85% of the wheat grain's total protein content. They contribute in different ways to the rheological properties of dough. As known, gliadins confer viscosity and extensibility while glutenins improve dough strength and elasticity (WIESER, 2007; WRIGLEY, 1996). Although HMW-GS amount and type are associated with technological and bread-making quality, allowing stronger dough formation, an appropriated glutenin/gliadin ratio has an important role in the wheat's rheological properties of dough (SHEWRY; HALFORD, 2002). Studies demonstrated that wheat cultivars with similar HMW-GS content showed different rheological properties according to different glutenin/gliadin ratios (BARAK *et al.*, 2013). Highest polymeric/monomeric ratio was observed in a modern genotype of durum wheat of higher quality when compared with lower quality genotypes (DE SANTIS *et al.*, 2020).

Besides the technological aspect, gluten proteins are also involved in food allergies and intolerances, such as celiac disease (CD) (PRESUTTI *et al.*, 2007). The high proline content of these proteins may reduce its susceptibility to protease activity in the digestive process. Consequently, it leads to the flattening of intestinal villi flattening and malabsorption of nutrients (SHEWRY; TATHAM, 2016). A gluten-free diet is essential to avoid CD-related symptoms. For this reason, it is imperative to detect the presence of these proteins to ensure food safety (ALVES *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2019). It has been recently shown, by proteomic approaches, that lower quality wheat flour samples had higher amounts of immunogenic peptides abundance than better quality samples (ALVES *et al.*, 2018; DE SANTIS *et al.*, 2020).

A proper extraction of protein is critical for gluten analysis. The complex structure of the gluten network and the food matrix composition are obstacles to achieve a very efficient extraction (XHAFERAJ *et al.*, 2020). Due to the amounts of conserved cysteine residues the presence of disulphide bonds, the solubilization of gluten proteins is hindered, mainly in glutenin fraction, which comprises large polymer aggregations with molecular weight from 100 kDa to over 1,000 kDa (WIESER, 2007; WRIGLEY, 1996). Gliadins and glutenins are also known for their high proline and glutamine content, as by its low content of lysine, arginine and histidine (WIESER, 2007). In addition to that, both fractions are extremely heterogeneous and complex, presenting repetitive motifs, what makes its analysis by conventional proteomics techniques challenging. The polymeric nature of gluten proteins and their heterogeneity defies obtaining highly purified extracts with just one group of proteins (LEXHALLER *et al.*, 2019). Factors such as incomplete information on protein sequences and not complete sequenced genomes limits the protein identification. The complex and highly homologous sequences of gluten proteins require careful interpretation of ion data for accurate sequence assignment (AGHAGHOLIZADEH *et al.*, 2017; MARTINEZ-ESTESO *et al.*, 2016). Elucidating important aspects of protein composition that are closely related with dough quality is one of the main objectives of wheat proteome studies (SKYLAS *et al.*, 2005).

In this context, the improvement of mass spectrometry (MS) techniques enables a better understanding about these proteins. Some studies have shown that data independent acquisition (DIA) MS enhances complex samples analysis and allows wide dynamic range coverage (DISTLER *et al.*, 2014; GEROMANOS *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2017; VICTORIO *et al.*, 2018). DIA approaches alternate low and high energy in the collision cell to analyze all ions generated in the source, and then precursors and fragments reach the analyzer quasi-simultaneously. Results of these methods are more comprehensive due the fragmentation, regardless from the signal intensity (BROMILOW *et al.*, 2017b; DISTLER *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2017). By using proteomic approaches, it is possible to associate the protein composition of wheat with its technological quality. Metabolic proteins, such as albumins and globulins, were analyzed by ultra-definition mass spectrometry (UDMS^E) and were differentially abundant in wheat flours of different technological qualities. Proteins of this fraction involved in the gluten protein folding

process, named puroindolines and chaperones, were found up-regulated in superior quality extract and down-regulated in the lower ones (VICTORIO *et al.*, 2018). Gluten fraction study also showed differences between cultivars. For the glutenin fraction, Dy10 subunit was not found in the low-quality cultivar and had high percentage in higher quality cultivars. The content of x-HMW-GS and y-HMW-GS seems to be correlated with wheat quality. When analyzing flat bread, x-HMW-GS was determinant for its quality. It was demonstrated that higher amounts of γ -gliadins decrease the quality of wheat, what is inversely correlated to higher contents of α/β -gliadin. By comparing glutenin/gliadin ratio, superior quality flour presented the greatest values, while inferior quality flour presented the lowest one (AGHAGHOLIZADEH *et al.*, 2017). For that matter, advanced proteomics methods lead to a high capacity of protein detection, being important for wheat research (AFZAL *et al.*, 2020).

In this context, this work presents a nano ultra-performance liquid chromatography (nanoUPLC) coupled to mass spectrometry analysis using DIA method in order to identify and quantify gluten proteins from nine wheat genotypes grouped by different technological qualities. The method was effective to analyze wheat storage proteins and allowed a clear distinction between genotypes, providing a better understanding of the wheat flour quality.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL

Wheat (*Triticum aestivum*) flours from nine Brazilian genotypes of different technological qualities were analyzed. Samples were provided by OR Melhoramento de Sementes Ltda. (Passo Fundo, RS, Brazil) in collaboration with the University of Passo Fundo (UPF). The seeds were cropped during 2014/2015, with normal harvesting and management of seeds. The technological qualities classification was based on gluten force (PELEGRIIN *et al.*, 2016), previously determined by alveograph and farinograph methods, using tenacity, extensibility and stability of dough, mass development time and water absorption as parameters, respectively (Table 1). The flours were grouped as low (LW) quality (Campeiro, ORS25, ORS27); medium (MD) quality (Marfim, ORS1401, ORS1402), and superior (SP) quality (Ametista, Guabiju, Jadeíte 11).

Table 1. Technological quality characterization of different Brazilian wheat genotypes according to rheological and physico-chemical parameters, harvest 2014/2015.

Genotype	Commercial Classification*	TQ	W (Joules)	E (min)	FN (s)	P (mm)	L (mm)	P/L	WA (%)
ORS 25	Basic	Low	137.7 ± 41.2	7.3 ± 3.1	334.0 ± 18.4	49.3 ± 10.5	92.3 ± 17.2	0.5 ± 0.0	53.6 ± 1.7
Campeiro	Basic	Low	115.3 ± 12.5	6.7 ± 1.4	286.3 ± 14.1	32.0 ± 2.6	157.0 ± 15.5	0.2 ± 0.0	49.2 ± 0.6
ORS 27	Domestic	Low	161.5 ± 23.5	8.8 ± 0.8	309.0 ± 46.0	58.5 ± 1.5	103.0 ± 14.0	0.6 ± 0.1	57.5 ± 0.5
ORS 1401	Bread	Medium	258.3 ± 65.5	19.3 ± 9.0	356.8 ± 47.1	91.9 ± 23.4	83.9 ± 3.7	1.1 ± 0.4	59.7 ± 6.2
ORS 1402	Basic	Medium	206.7 ± 56.6	11.4 ± 2.2	348.0 ± 42.0	70.3 ± 17.8	102.7 ± 15.0	0.7 ± 0.2	58.7 ± 6.5
Marfim	Bread	Medium	310.7 ± 56.3	17.7 ± 4.7	348.8 ± 24.8	71.0 ± 7.5	149.7 ± 9.5	0.5 ± 0.0	55.8 ± 0.7
Jadeíte 11	Improver	Superior	418.3 ± 10.7	14.9 ± 1.9	371.3 ± 25.3	114.7 ± 5.5	91.9 ± 21.3	1.3 ± 0.4	61.5 ± 0.8
Ametista	Improver	Superior	437.3 ± 33.5	20.9 ± 5.3	347.3 ± 48.4	134.3 ± 13.1	80.8 ± 18.6	1.7 ± 0.4	62.2 ± 0.2
Guabiju	Bread	Superior	255.3 ± 15.6	13.3 ± 1.3	376.7 ± 45.1	138.0 ± 6.0	101.3 ± 6.5	1.4 ± 0.0	63.8 ± 0.8

Technological quality (TQ), gluten force (W), stability (E), falling number (FN), tenacity (P), extensibility (L), water absorption (WA). *Commercial Classification according to Brasil (2010).

2.2 PROTEINS EXTRACTION

The protein extraction was performed as described in Alves et al. (2018). One hundred milligrams of each flour were extracted with 1 mL of buffer (80 mM Tris-HCl, 40 mM iodoacetamide, pH 8.0). The samples were briefly vortexed and then incubated in shaker (200 rpm, 60 min, 25 °C) (TE-420, Tecnal, Brazil). After centrifugation (10,600 x g, 10 min, 20 °C) (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Germany), the supernatants containing albumins and globulins were discarded. The remaining pellets were resuspended in PBS buffer (0.5% SDS, 2% β-mercaptoethanol, pH 7.4) and incubated in shaker overnight (200 rpm, 25 °C). After centrifugation (10,600 x g, 15 min, 4 °C), the supernatants were washed and concentrated using a 3 kDa buffer exchange filter (Amicon, Millipore, Ireland). Three washing steps were performed using ammonium bicarbonate (NH4HCO3) buffer (50 mM, pH 8.5), followed by centrifugation (14,000 x g, 60 min, 8 °C). Protein content was determined by Bradford method (1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard. Samples were diluted 10 times and 20

μL was aliquoted in triplicate. The reaction time was 5 min after the addition of 1 mL of Bradford reagent (Sigma-Aldrich). The absorbance was measured at 595 nm in a spectrophotometer (UV-2700, Shimadzu, Japan).

2.3 SAMPLE PREPARATION FOR NANOUPLC-MS^E ANALYSIS

Prior to the digestion step, protein extracts were diluted in ammonium bicarbonate (50 mM, pH 8.5) to reach the concentration of 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. The extracts were pooled together according to the technological quality classification, grouping 20 μL of each sample. Then, three pools with 60 μL of final volume followed to the digestion step. For protein digestion, 25 μL of 0.2% RapiGEST SF (Waters Corp., Milford, MA) were added in each sample containing 60 μg of protein, followed by vortexing and incubation at 80 °C for 15 min. After centrifugation (14,000 $\times g$, 10 min, 4 °C), 2.5 μL of 100 mM dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) prepared in NH₄HCO₃ (50 mM, pH 8.5) were added to each sample. The samples were vortexed and incubated at 60 °C for 30 min followed by centrifugation (14,000 $\times g$, 10 min, 4 °C). Then, 2.5 μL of 300 mM iodoacetamide (IAM) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in NH₄HCO₃ (50 mM, pH 8.5) were added and samples were homogenized and incubated in the dark at 20 °C for 30 min. Afterwards, trypsin/Lys-C (Promega, Madison, USA) in NH₄HCO₃ (50 mM, pH 8.5) was added at a 1:60 enzyme:protein ratio. The samples were briefly vortexed and centrifugated for 30 s and digested overnight at 37 °C under stirring. After digestion, 10 μL of 5% v/v trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) were added to stop the digestion. The samples were incubated at 37 °C for 90 min without stirring, centrifuged (14,000 $\times g$, 90 min, 4 °C), the supernatants were transferred to new vials and centrifuged again (14,000 $\times g$, 90 min, 4 °C). The supernatants were transferred to total recovery vials (Waters, USA), identified and placed in ultra-freezer (-80 °C) (IULT 335 D, Indrel, Brazil) until data acquisition.

2.4 NANOUPLC-MS^E ANALYSIS

Tryptic peptides were analyzed using a nanoACQUITY UPLC system (Waters Corp., Milford, MA) coupled to Synapt G2-S high-definition mass spectrometer (HDMS) (Waters Corp., Manchester, UK) equipped with hybrid analyzers such as a quadrupole followed by an orthogonal acceleration time-of-flight (Qq-oaTOF) geometry. To ensure that all

samples were injected with the same amount on column, prior to analysis, stoichiometric measurements based on scouting runs of the integrated total ion account (TIC) were performed to ensure standardized molar values across all conditions. The LC/MS runs were carried out in triplicate for each sample. The chromatographic system was equipped with a nanoEase BEH130 C18 (5 µm, 180 µm x 20 mm) trap column (Waters Corp., USA) and a nanoAcuity HSS T3 C18 (1.8 µm, 100 µm x 100 mm) reversed-phase column (Waters Corp., USA). Mobile phase A consisted of water and mobile phase B consisted of acetonitrile, both with 0.1% (v/v) formic acid. The peptides were separated using chromatographic methods with the following gradient: 7 to 40% of mobile phase B in 90 min, followed by a cleaning column gradient of 40 to 85% of B for 1 column volume (cV); maintained in 85% of B for 2 cV; then from 85 to 7% of B in 1 cV. The flow rate was 600 $\eta\text{L}.\text{min}^{-1}$. The analytical column temperature was maintained at 55 °C and the sample manager temperature was 8 °C. The lock mass was derived from an auxiliary pump using a flow rate of 250 $\eta\text{L}.\text{min}^{-1}$ at a concentration of 200 fmol.uL⁻¹ of [Glu¹]-Fibrinopeptide B human (Glu-Fib) to the reference MUX sprayer of the NanoLockSpray source.

For all measurements, the mass spectrometer was operated in the resolution mode with a typical *m/z* resolving power of at least 35.000 FWHM. All analyses were carried out using nano-electrospray ionization in the positive ion mode nanoESI(+) and a NanoLockSpray ionization source (Waters Corp., Manchester, UK). The lock mass channel was sampled at a frequency of 30 s. The ion source block temperature was set to 70 °C and capillary voltage was set to 2.7 kV. Ions were acquired with *m/z* between 50-2000, scanning time of 0.5 s, cone voltage of 30 V. The time-of-flight analyzer of the mass spectrometer was calibrated with a MS/MS spectrum of Glu-Fib. The final instrument calibration was obtained by the specific *y*⁺ and *b*⁺ fragments derived from the double charged precursor ion $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+} = 785.8426$ GFP signal. Samples were acquired by MS^E multiplex mode, applying simultaneously low and high fragmentation energy (15-55V) at T-wave collision-induced dissociation cell filled with argon gas.

2.5 DATA PROCESSING

In order to identity and quantify peptides and proteins, MS quantitative data packages were processed with the use of dedicated algorithms (GEROMANOS *et al.*,

2009). The MS data were processed and searched using the Progenesis QI for Proteomics (QIP) (Nonlinear Dynamics, UK). The UNIPROT protein repository release 2017_02 (<http://www.uniprot.org>, 136,884 entries) with database annotations for *T. aestivum* was used. The database used were reversed “on-the fly” during the database queries by the use of ProteinLynxGlobalServer (PLGS) (Waters Corp., Manchester, UK) and appended to the original database to assess the false discovery rate (FDR) during identification (NEVES *et al.*, 2017). The parameters for database searching were tryptic peptides with a maximum of one missed cleavage, carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and oxidation of methionine as variable modification. The parameters set as default were peptide mass error tolerance of 10 ppm, fragment mass error tolerance of 20 ppm and maximum FDR of 4%.

The samples were compared in pairs to obtain a volcano plot (SP vs. LW, MD vs. LW and SP vs. MD) and the following filters were used: minimum of one unique peptide and two peptide count, coefficient of variation (maximum absolute CV of 0.3), max fold change (>1.5, log₂ = ±0.6) and ANOVA (p < 0.05). Only coexisting proteins in both conditions and proteins that were present in the 3 of 3 replicates (3/3) were considered to compare the conditions.

Functional domains were predicted for uncharacterized proteins that were differentially abundant using the following databases InterPro 67.0 (1st March 2018, EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (FINN *et al.*, 2017) Pfam 31.0 (March 2017, 16712 entries, EMBL-EBI, <http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab0>) (FINN *et al.*, 2016) and Prosite (Release 2018_03 of 28-Mar-2018 contains 1806 documentation entries, 1309 patterns, 1214 profiles and 1234 ProRule, <https://prosite.expasy.org/>) (SIGRIST *et al.*, 2010). The searches were made with default parameters. The predominant domain for each protein code was chosen.

2.6 1D SODIUM DOCEDYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (1D SDS-PAGE)

The electrophoresis gel was performed as described by Morel (1994). Laemmli buffer system (1970) was used with 10.3% acrylamide gels. The gel was run at 40 mA for 4 h 30 min at 18 °C. The samples were extracted using a solution containing 2% SDS and

40% glycerol and 20 µL of each sample was loaded in the wells. The gel was incubated overnight in 15% trichloroacetic acid, rinsed for 5 min with tap water and stained in 12.5% trichloroacetic acid with 0.14% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250.

2.7 STATISTICAL ANALYSIS

ANOVA was given by the Progenesis QIP and the coefficient of variation (CV) was calculated for replicates of each variable. A heat map representing protein abundance was carried out using MetaboAnalyst 4.0 (Xia Lab, <http://www.metaboanalyst.ca/>) for annotated proteins as well as for uncharacterized proteins after domain prediction. Principal component analysis (PCA) was performed with Progenesis QIP and implemented in order to assess the distinction between groups of different technological quality.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 NANOUPLC-MS^E RESULTS

Collectively, 3,545 peptides and 1,297 proteins were identified with average of 3 peptides per protein. After applying the minimum of two peptides at identification level and maximum absolute CV of 0.3 at quantitation level as filters, on average for all replicates and conditions, 3,070 peptides and 743 proteins were obtained with FDR of 0.6 % and 1.1 %, respectively (see supplementary data, S1). In order to verify if samples could be compared, data were plotted in a dynamic range graph (Fig.1). Dynamic ranges of different samples presented the same trend indicating that the quantitative distribution of intracellular protein was similar between them. In general, samples of complex biological systems present dynamic ranges of 3 orders of magnitude ($\log_{10}\text{max} = 3$) (SOUZA *et al.*, 2017). In this study, dynamic ranges of detected proteins presented more than 6 orders of magnitude ($\log_{10}> 6$) showing this proteomic approach was efficient to identify proteins in complex samples. The results are according to previous studies applying nanoUPLC-UDMS^E to analyze wheat metabolic proteins, in which more than 5 orders of magnitude were found (VICTORIO *et al.*, 2018).

Trying to overcome the challenge of fractioning the gluten proteins, the enzymes trypsin plus Lys-C were used, and the data processed by the Progenesis QIP showed that more than 70% of the identifications were made without missed cleavages and more than 20% with only one missed cleavage (see supplementary data, S2).

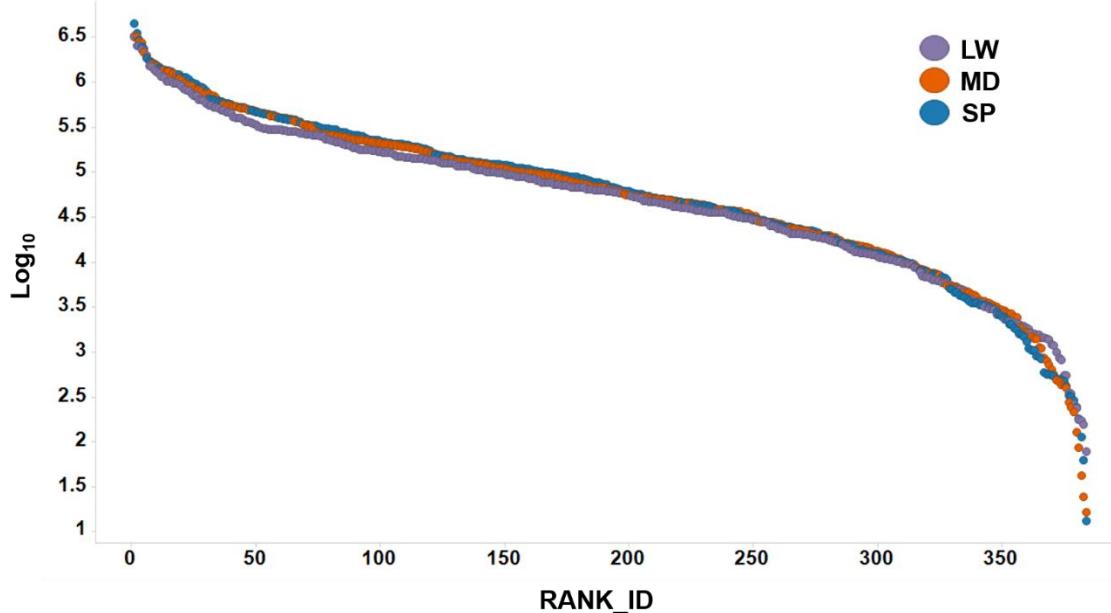


Fig. 1. Dynamic range of wheat flour samples, low (LW), medium (MD) and superior (SP) quality classification. The rank of identified proteins is plotted in the x axis and y axis is represented by the log of abundance quantified proteins.

Considering only proteins that appear in 3 of 3 replicates of each sample and without other filters, 384 proteins were identified and quantified in this work (see supplementary data, S1). Most of them (~78%) are not yet described in the protein databank, according to their biological function. Factoring only the annotated proteins, 46 presented highest mean abundance on SP sample, highlighting HMW-GS Dx5 (UNIPROT accession: P10388), HMW-GS (PC256 Fragment and P02861), alpha/beta-gliadin (P04724 and P04727), LMW-GS (B2Y2Q6, B2Y2S6, Q8W3V4, Q6SPZ3, Q00M61, B2BZD1, B2Y2Q1, P10385 and Q00M56), gamma-gliadin B (P06659), protein disulphide-isomerase (PDI) (A0A1D5Y681), gamma-gliadin (A1EHE7), alpha-gliadin (A0A0E3Z7G8 fragment), gamma-gliadin B-I (P04729 and M9TG60), and alpha-gliadin (I0IT65). For MD sample, 25 proteins presented highest mean abundance and can be found gamma-gliadin (P21292 and Q94G92), PDI (A0A1D5XQQ1), puroindoline-B (B1GXL6) and LMW-GS 1D1 (P10386). On LW sample, were found 15 proteins, being the main HMW-GS DY10

(P10387), alpha-gliadin (J7HT09), alpha/beta-gliadin (P04726), gamma-gliadin (M9TGF7), puroindoline-B (Q10464) and puroindoline-A (P33432). PDIs and puroindolines are metabolic proteins of wheat. While the first ones are related with storage protein folding (KIMURA *et al.*, 2015), the others promote a positive impact on baking (OSIPOVA *et al.*, 2012). In agreement with our data, PDIs were found up regulated in higher quality wheat samples when compared with lower quality samples in a study performed with metabolic proteins. In this study, puroindoline-A also was found up regulated in LW samples (VICTORIO *et al.*, 2018). It is worth mentioning that some PDI isoforms may no longer be detectable in the endosperm when the protein synthesis decreases at grain maturity (SKYLAS *et al.*, 2005).

3.1.1 Protein profile cluster of nanoUPLC-MS^E data

For better understanding the high-performance data provided by LC-MS, a principal component analysis (PCA) was performed (Fig. 2). Considering identified and quantified proteins as parameters it is possible to realize the distinction between groups of different technological qualities. The first two principal components (PC) explain 70% of the variation between samples. Also, it is possible to observe the separation of LW sample from the MD and SP samples. In a work carried out with metabolic gluten proteins the same pattern could be observed in the PCA (VICTORIO *et al.*, 2018). A marked separation among samples can be observed along PC1, corroborating other results with different quality samples (DE SANTIS *et al.*, 2020). Protein abundance profiles and domain prediction data probably contribute for explaining the samples discrimination found in PCA.

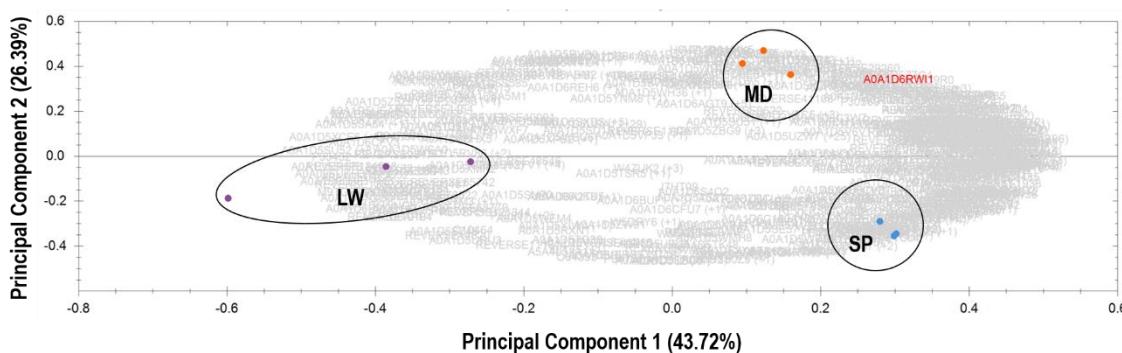


Fig. 2. Principal component analysis (PCA) of wheat flour samples: low (LW), medium (MD) and superior (SP) quality classification. Identified and annotated proteins are in gray and red.

3.2 PROTEIN ABUNDANCE PROFILES OF SAMPLES COMPARED IN PAIRS

After applying the filters mentioned in 2.5 section, data were presented in volcano plots (Fig. 3) to obtain an overview of differentially abundant proteins (DAP) by comparing each two samples. In total, 116 DAP were found when compared SP x LW, MD x LW and SP x MD. The comparison between SP and MD samples presented the highest number of DAP (46), being 34 up-regulated and 12 down-regulated. For these samples, 102 proteins had unchanged abundance and 242 proteins were out of one or more filters. When comparing SP and LW samples, 36 proteins were found differentially abundant (31 up-regulated and 5 down-regulated), 72 unchanged and 280 proteins were out of filters. Finally, the comparison between MD and LW samples showed 34 DAP (28 up-regulated and 6 down-regulated), 63 unchanged and 291 out of filters.

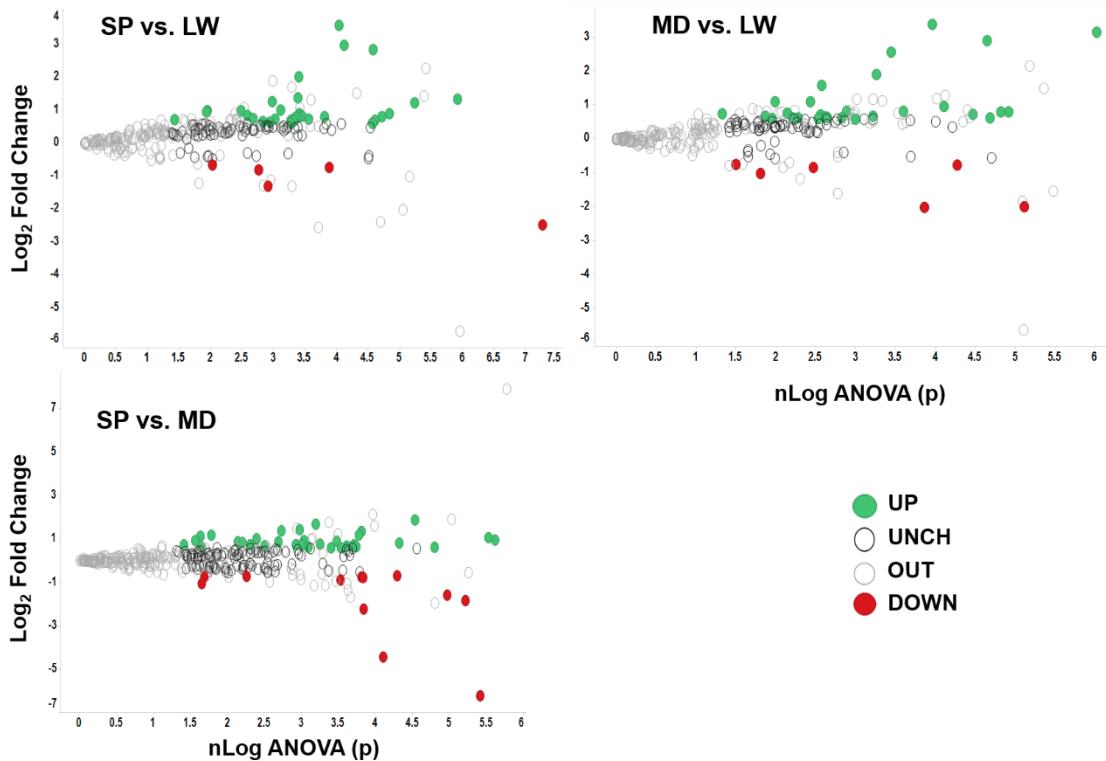


Fig. 3. Volcano plots comparing the wheat flour samples in pairs, low (LW), medium (MD) and superior (SP) ($p < 0.05$). The green dots represent up-regulated proteins (max fold change > 1.5), while red dots represent down-regulated proteins (max fold change < -1.5), black empty dots the considered unchanged proteins and gray empty dots were out of filters (minimum one unique peptide, two peptide count, CV of 0.3, max fold change < 1.5 , $P < 0.05$ and/or proteins in 3/3 replicates).

Only 35% of DAP have been described according to their biological function in protein databank (Table 2). Interestingly, low molecular weight glutenin subunits were up-regulated only on SP flours. According to some studies, that points to the importance of LMW-GS fraction to wheat quality (D'OVIDIO; MASCI, 2004; LIU *et al.*, 2005). Other proteins of gluten fraction as α/β -gliadins and γ -gliadins were found in higher concentration in SP samples. Some wheat proteins that do not belong to gluten fraction also were found in the extracts. Puroindoline-A was found in major concentration in LW sample. Puroindoline family is related with wheat grain hardness (HEINZE *et al.*, 2016). Two β -amylases and one trypsin inhibitor appear in major concentration in SP sample. A heat map cluster was built for these proteins (see supplementary data, S3) showing that SP sample presents different pattern from MD and LW samples, being the last ones grouped together by the dendrogram. In a previous study, puroindolines were found in gliadin extract, β -amylases were found in LMW-GS extract and α -amylase/trypsin inhibitor were found in all gluten protein extracts. LMW-GS were also detected in all extracts probably due to their polymeric nature and their molecular weight similar to α -gliadins. This data confirms that obtaining pure extracts is a great challenge (LEXHALLER *et al.*, 2019).

Table 2. Differentially abundant and annotated proteins.

Accession UNIPROT	Description UNIPROT	PC	PU	ANOVA (p)	-LogP (ANOVA)	Max fold change	Log ₂
<i>Superior vs. Low</i>							
A0A1D6B080	Auxin response factor	2	2	0.00	4.12	7.81	2.96
A1EHE7	Gamma-gliadin	4	2	0.00	2.98	2.39	1.26
A0A1D5ST37	Malate dehydrogenase	5	5	0.00	2.48	1.97	0.98
A0A1D5ZDV7	rRNA N-glycosidase	4	1	0.01	1.94	1.92	0.94
A0A1D5YFA6	Beta-amylase	1	3	0.00	3.81	1.73	0.79
		4					
B2Y2Q6	Low molecular weight glutenin subunit	1	1	0.00	4.72	1.73	0.79
		0					
A0A1D5S7P5	Pyruvate_phosphate dikinase	6	4	0.00	3.39	1.72	0.78
A0A1D6RTR9	WAT1-related protein	3	1	0.00	3.02	1.65	0.72
Q0Q5D9	Globulin 1	1	2	0.00	3.33	1.60	0.68
		1					
A0A1D6BQM7	60S acidic ribosomal protein P0	5	5	0.00	3.27	1.51	0.59
Q94G92	Gamma-gliadin	3	2	0.00	3.88	1.68	-0.75
P33432	Puroindoline-A	4	4	0.00	7.27	5.64	-2.49
<i>Medium vs. Low</i>							
A0A1D6B080	Auxin response factor	2	2	0.00	2.43	2.14	1.10
A0A1D5ST37	Malate dehydrogenase	5	5	0.01	1.87	1.58	0.66
P21292	Gamma-gliadin	2	1	0.01	2.21	1.53	0.62
A0A1D5S7P5	Pyruvate_phosphate dikinase	6	4	0.00	2.53	1.51	0.60
P0CZ05	Avenin-like b2	4	2	0.03	1.50	1.69	-0.76
I0IT65	Alpha-gliadin	2	2	0.00	2.47	1.80	-0.85
P33432	Puroindoline-A	4	4	0.00	5.11	4.02	-2.01
<i>Superior vs. Medium</i>							
A0A1D6B080	Auxin response factor	2	2	0.00	4.54	3.65	1.87
A0A1D6BR39	Glycosyltransferase	2	2	0.00	2.97	2.68	1.42
A0A1D6RTR9	WAT1-related protein	3	1	0.00	3.77	2.26	1.18
A0A0E3Z7G8	Alpha-gliadin (Fragment)	2	2	0.00	5.62	1.94	0.95
A0A1D5ZDV7	rRNA N-glycosidase	4	1	0.03	1.57	1.91	0.94
Q0Q5D9	Globulin 1	1	2	0.00	3.03	1.89	0.92
		1					
A0A1D5XXC7	Beta-amylase	1	2	0.00	3.47	1.88	0.91
		4					
P06659	Gamma-gliadin B	5	4	0.00	2.69	1.84	0.88
I0IT65	Alpha-gliadin	2	2	0.01	2.14	1.82	0.86

Accession UNIPROT	Description UNIPROT	PC	PU	ANOVA (p)	-LogP (ANOVA)	Max fold change	Log ₂
A1EHE7	Gamma-gliadin	4	2	0.01	2.20	1.79	0.84
A0A1D5YFA6	Beta-amylase	1 4	3	0.00	3.25	1.68	0.75
A0A1D6BQM7	60S acidic ribosomal protein P0	5	5	0.00	3.71	1.65	0.72
A0A1D6BRM9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5	2	0.00	3.01	1.65	0.72
P04727	Alpha/beta-gliadin	2	1	0.00	3.61	1.61	0.69
A0A1D5WNG5	Fructose-bisphosphate aldolase	7	1	0.00	2.50	1.60	0.68
P04724	Alpha/beta-gliadin A-IV	3	3	0.00	3.70	1.57	0.65
P81713	Bowman-Birk type trypsin inhibitor	4	4	0.00	3.09	1.54	0.62
M9TG60	Gamma-gliadin 1	3	2	0.02	1.64	1.54	0.62
B2Y2Q1	Low molecular weight glutenin subunit	9	1	0.00	3.53	1.52	0.60
P21292	Gamma-gliadin	2	1	0.00	3.83	1.70	-0.77
Q94G92	Gamma-gliadin	3	2	0.02	1.65	2.08	-1.05

Peptide count (PC), number of unique peptides (PU), negative log₁₀ ANOVA (-LogP (ANOVA)), log₂ max fold change (Log₂). Log₂ values equal or greater than 0.6 correspond to up-regulated proteins and equal or lower than -0.6 correspond to down-regulated proteins.

3.2.1 Cluster of functional domains of differentially abundant and not described proteins

A domain prediction analysis was carried out to obtain a better understanding about the functionality of those 65% of DAP, which remain not described in terms of biological function (see supplementary data, S4). A heat map cluster was built using the obtained data (Fig. 4) and it is possible to observe that LW sample presents different pattern from the others, with lower abundance of functional domains. MD and SP samples were grouped together by the dendrogram, although data show different profiles between samples. Interestingly, a heat shock protein HSP20 domain appears in higher abundance in SP sample. HSP belong to chaperones family that play a role to adequate folding of storage proteins and it can affect wheat flour quality by impacting the polymers formation (KIMURA *et al.*, 2015; OSIPOVA *et al.*, 2012). Another member of this family (HSP70) has already been reported to be up-regulated in SP and MD samples of wheat flour (VICTORIO *et al.*, 2018). SP sample also showed higher abundance of proteins involved

in carbohydrate metabolism (sucrose synthase), chromatin organization (histone H1/H5) and chromosome remodeling (RNA-binding). Sucrose synthase is important for sucrose metabolism and their increased abundance may impair the starch biosynthesis by decreasing sucrose level (MEHRI *et al.*, 2020). While histones H1 act as linker proteins that can confer a more condensed chromatin structure, RNA-binding proteins are involved with rRNA- and mRNA- processing in the nucleus, also acting in the cytoplasm in RNA transport, localization, storage and metabolism (FINNIE *et al.*, 2011).

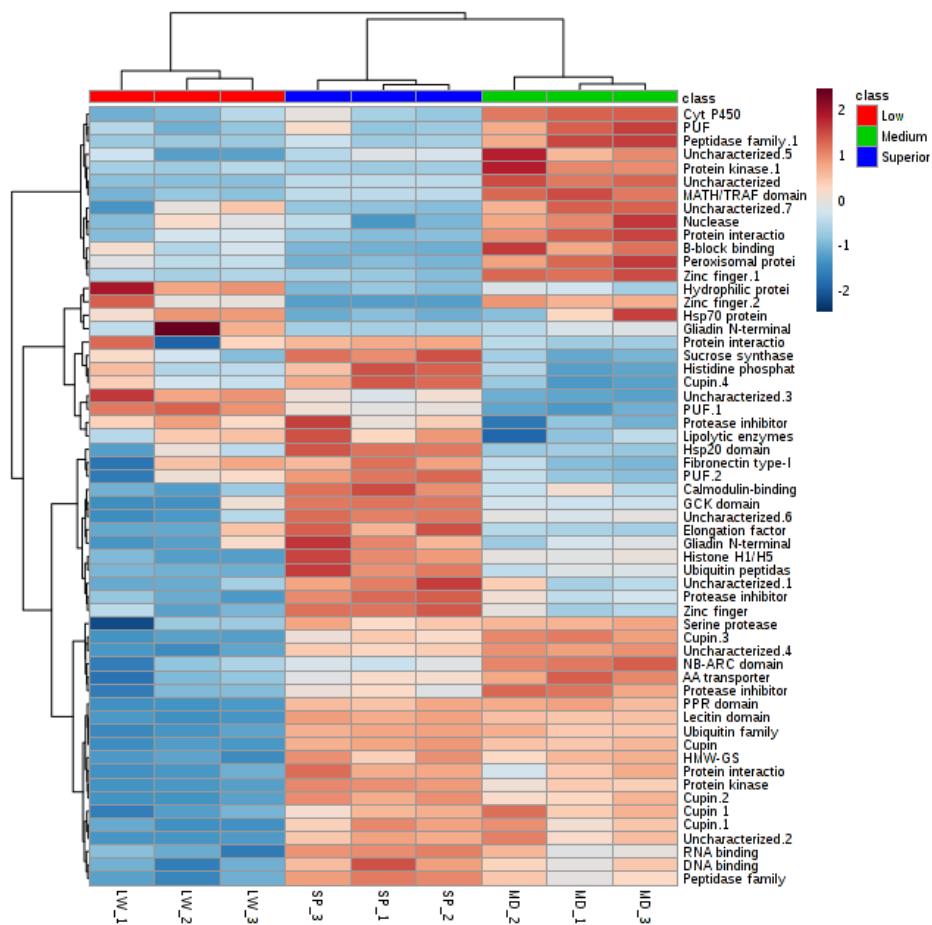


Fig. 4. Heat map illustrating the clustering of functional domains from uncharacterized differentially abundant proteins that were found in low (LW), medium (MD) and superior (SP) samples. The horizontal axis presents replicates from each sample and the vertical axis presents the domains. Color gradient represents the variation of protein abundance. Highest quantities are represented by dark red and lowest quantities by dark blue. PUF (protein of unknown function), GCK domain is related with intracellular signaling pathways.

3.3 GLUTENIN SUBUNITS CHARACTERIZATION BY ELECTROFORESIS

Protein profile of gluten proteins from wheat genotypes are presented in 1D SDS-PAGE (Fig. 5). The HMW-GS are shown on top of the gel and the LMW-GS at the bottom. Two genotypes were used as pattern (Bermude and Toback). For HMW-GS, we numbered the bands based on Payne and Lawrence (1983), that previously identified HMW-GS by SDS-PAGE. Bermude presents five bands (2*, 5, 6, 8 and 10) and Toback presents three bands (2, 7 and 12). In agreement with other paper (PAYNE, 1987) the analyzed genotypes showed two subunits coded by genes at *Glu-D1* (5+10 or 2+12 alleles), one or two by *Glu-B1* (7 allele) and one or none by *Glu-A1* (1 or 2* alleles). Most of the genotypes analyzed on this study present subunit 5 as slowest band and 10 as fastest band (ORS 25, ORS 27, ORS 1401, Marfim, Ametista and Jadeíte 11). The 5+10 subunits have been related to good bread-making quality (COSTA *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2009; PAYNE *et al.*, 1981). Although, in this work, these data do not allow a distinction from genotypes since these subunits were found in samples of all technological qualities. Two genotypes (Campeiro – LW; and ORS 1402 – MD) presented the subunit 2* like Bermude pattern and this band migrated slowest than the 5 subunit. Interestingly, one genotype of superior technological quality (Guabiju) presented the 2 and 12 subunits as the Toback pattern, however, this genotype of superior quality presented the subunit 1 slowest than 2. Although 2+12 have been correlated with smaller sedimentation volume when compared with 5+10 subunits, the subunit 1 was reported as presenting strong correlation with bread-making quality (LIU *et al.*, 2005; PAYNE *et al.*, 1981). HMW-GS 6+10 alleles, reported in best gluten technological quality samples (GRAZIANO *et al.*, 2019), were found only on Bermude pattern and HMW-GS 20 allele was not found. This allele has been associated with negative dough properties when *Triticum durum* was analyzed, so this result could be expected (GRAZIANO *et al.*, 2019; SHEWRY *et al.*, 2003).

For LMW-GS, most of analyzed genotypes were observed in electrophoresis gel like Toback pattern. Only two genotypes (Campeiro and ORS1401) showed changes in some bands. These samples are different in terms of technological quality, belonging to low and medium quality, respectively. In SDS-PAGE the allele identification is difficult because of the banding pattern complexity of LMW-GS that present overlapped bands. For a better

understanding of this fraction, two-dimensional gel electrophoresis (2-DGE) could be applied (MOREL, 1994). This method allows to separate proteins in two independent physiochemical parameters, considering their isoelectric point and molecular mass (SKYLAS *et al.*, 2005), providing provide a better LMW-GS separation. When using 2-DGE to analyze a common wheat genotype 17 spots were resolved from the 43 identified LMW-GS genes. Due LMW-GS gene family has high similarity of sequences with their repeat sequence, each spot contained a large number of proteins (BEOM *et al.*, 2018).

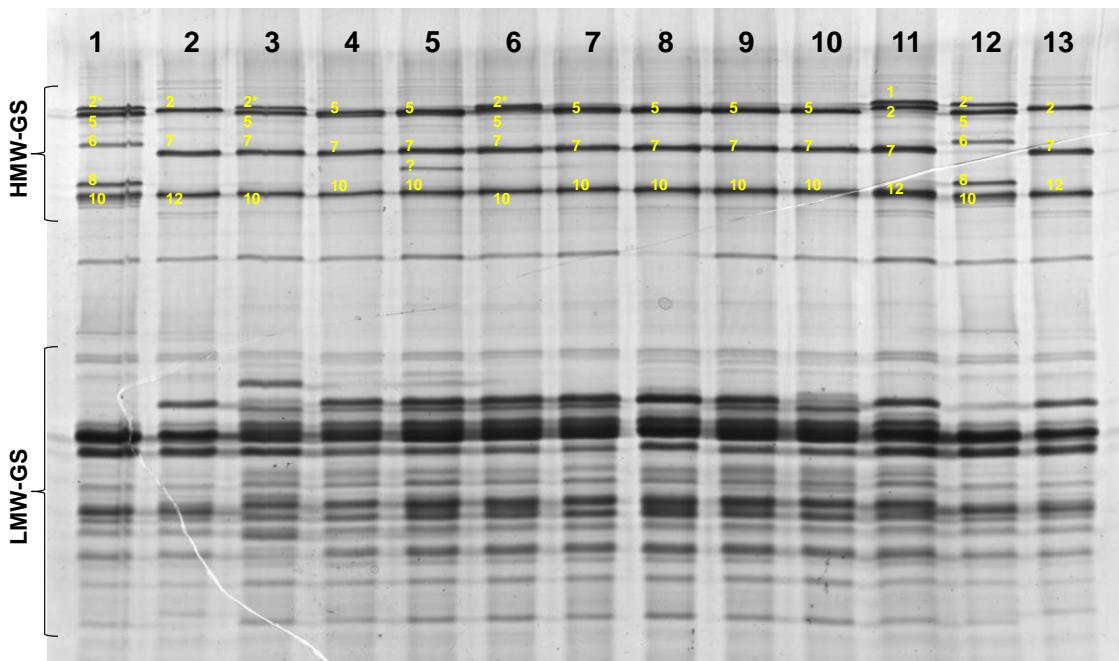


Fig. 5. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis patterns of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) and low molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) from wheat genotypes. The numbers on the top of the figure represent the genotypes. The patterns are Bermude (1 and 12) and Toback (2 and 13). The analyzed genotypes are Campeiro (3), ORS 27 (5) and ORS 25 (7) of low quality, Marfim (4), ORS 1402 (6) and ORS 1401 (10) of medium quality and Jadeíte 11 (8), Ametista (9) and Guabiju (11) of superior quality. HMW-GS are labeled according to the nomenclature of Payne & Lawrence (1983). Unknown bands are marked by an interrogation point.

4 CONCLUSIONS

A proteomic approach was applied to gluten proteins grouped by technological quality to better understand their relationship with wheat flour quality. A wide protein coverage was obtained and both abundance data and domain prediction demonstrated

that low quality have different pattern when compared with higher quality flours. LMW-GS was found up-regulated in superior quality sample and gliadins were found in all samples. Although electrophoresis characterization of glutenin subunits did not allow a clear distinction from genotypes, the extracts presented different protein patterns, as demonstrated by the multivariate PCA. This work showed that nanoUPLC-MS^E was effective to characterized wheat storage proteins and allowed a clear distinction between genotypes of different technological quality, providing a better understanding of the wheat flour quality.

Declarations of interest: none

Author statement

Verônica Victorio: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation. Data Curation, Writing - Original Draft, Visualization. **Thais Alves:** Investigation, Writing-review & Editing. **Gustavo Souza:** Methodology, Software, Data Curation. **Luiz Carlos Gutkoski:** Investigation, Resources. **Luiz Claudio Cameron:** Resources. Writing - review & Editing. **Mariana Ferreira:** Conceptualization, Resources, Writing - review & Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank OR Melhoramento de Sementes Ltda for providing wheat flour samples, Marie-Hélène Morel and Joëlle Bonicel for conducting the electrophoresis analysis and Dr. Carlos Andrés Rodríguez Vega for his assistance in the processing data. The authors acknowledge the Foundation for Research Support of State of Rio de Janeiro (FAPERJ) (26/010.100.988/2018; 26/202.709/2018), National Council for the Scientific and Technological Development (CNPq) (427.116/2018; 310.34/2019-4), Coordination for Improvement of Personnel with Higher Education (CAPES) (financial code 001) and the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO) for financial support.

CAPÍTULO 4 – UNTARGETED PROTEOMICS UNRAVELS THE PROTEIN PROFILE OF WHEAT FLOURS OF CONTRASTING TRAITS BASED ON GLUTEN-FORCE AND NEAR-ISOGENIC LINES DIFFERING BY *PINB-D1* ALLELE

V.C.M. VICTORIO^a, T.O. ALVES^a, M.P.C. PIMENTEL^a, F.A. ALMEIDA^b, V. SILVEIRA^b,

V.LULLIEN-PELLERIN^c, M.S.L. FERREIRA^{ad*}

^aLaboratory of Bioactives, Food and Nutrition Graduate Program, PPGAN, Federal University of the State of Rio de Janeiro, UNIRIO, Av. Pasteur, 296, 22290-240, RJ, Brazil. ^bBiotechnology Laboratory, Center for Biosciences and Biotechnology (CBB), State University of North Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), RJ, Brazil. ^cIATE, University Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France. ^dCenter of Innovation in Mass Spectrometry-Laboratory of Protein Biochemistry (IMasS-LBP), UNIRIO, Brazil.

*Corresponding author. ^dCenter of Innovation in Mass Spectrometry (IMasS), Laboratory of Protein Biochemistry (LBP), UNIRIO, Brazil. *Corresponding author: mariana.ferreira@unirio.br

Artigo original a ser submetido à revista **Food Chemistry** (FI: 7,514; Qualis único Capes A1).

ABSTRACT

Total protein extraction was carried out for three pairs of wheat (*Triticum aestivum*) samples: whole wheat flours, refined wheat flours displaying contrasting characteristics in gluten-force (GF) and near-isogenic lines refined flours differing by *Pinb-D1* allele. Tryptic peptides were analyzed by NanoUPLC-HDMS^E. Proteomics data revealed that high GF and hard-type wheat flours showed greater number of proteins, greater amount of up-accumulated and exclusive proteins and even greater variety of biological process, when compared with their respective pairs low GF and soft-type phenotypes. Some storage proteins and small heat shock proteins were the best candidates for wheat specific markers associated with the characteristics of high GF and hard texture, while PINA, PINB2 and GSP can be considered as specific markers for the low GF and soft flours. Untargeted comparative proteomics unveiled the wheat proteome of flours with contrasting quality traits, contributing to the robustness of the research on wheat flour quality field.

Keywords: comparative proteomics; chemometric analysis; differentially accumulated proteins; functional annotation; technological quality; wheat proteome.

CAPÍTULO 5 – COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADOS PARA MELHOR CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO TRIGO: HDMS^E X UDMS^E

V.C.M. VICTORIO^{1,2}, M.C.B. SANTOS^{1,2}, C.T.S. D'ALMEIDA^{1,2}, A.F. MACEDO^{2,3}, G.H.M.F. SOUZA⁴, L.C. CAMERON², L.C. GUTKOSKI¹, M.S.L. FERREIRA^{1,2*}

¹Laboratório de Bioativos, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). ²Centro de Inovação em Espectrometria de Massas, Laboratório de Bioquímica de Proteínas (IMasS - LBP), UNIRIO. ³Laboratório Integrado de Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, UNIRIO. ⁴SpectraMass Ltd. *Autor correspondente.

Capítulo de livro. Frederico Celestino Barbosa. (Org.). **Nutrição em foco: uma abordagem holística**. 3^aed. Piracanjuba-GO: Editora Conhecimento Livre, 2020, v. 3, p. 405-433. <https://doi.org/1037423/200601222>

RESUMO

O trigo é um dos cereais mais importantes do mundo para o consumo humano. No Brasil, a pesquisa e a inovação aplicadas à cadeia produtiva do trigo são bastante desafiadoras. A qualidade intrínseca do grão trigo é determinada, principalmente, pela qualidade do glúten que depende da composição das proteínas de reserva e do perfil polimérico das gluteninas. Recentemente, a espectrometria de massas sequencial (*tandem mass spectrometry* - MS/MS) foi aplicada para identificar e caracterizar proteínas de trigo. No entanto, as proteínas do glúten apresentam alta homologia aminoacídica e são difíceis de serem discriminadas. Neste trabalho, a partir de ferramentas proteômicas foi proposto caracterizar as proteínas de trigo a partir de dois métodos de aquisição: espectrometria de massas de alta definição (HDMS^E) comparada com espectrometria de massas de ultra definição (UDMS^E) aplicando-se baixa e alta energia para fragmentação e sistema de mobilidade iônica. Farinhas de trigo brasileiro (*Triticum aestivum*), oriundas de duas variedades de qualidades tecnológicas contrastantes, foram submetidas à extração sequencial, *clean-up* e digestão proteica (LysC + Trypsin). Os peptídeos foram submetidos ao nanoUPLC acoplado ao espectrômetro de massas Synapt G2-S HDMS. Os dados foram processados no ProteinLynx Global Server v3.0 e a pesquisa foi realizada em um banco de dados personalizado do UniProtKB 2015_03v. Nas análises UDMS^E, observou-se um aumento de 80% para identificação total de peptídeos e

proteínas. Embora, em média, 3 peptídeos por proteína tenham sido identificados em ambos os métodos, a cobertura da sequência peptídica foi notavelmente melhorada no UDMS^E. Analisando-se os fragmentos *b* e *y*, foi obtida uma melhora significativa em íons com *m/z* superior a 1.200 em UDMS^E. Entre os *hits* aceitos (probabilidade de 95%), as proteínas solúveis apresentaram o maior número de identificação de proteínas (20), seguidas pelas gluteninas insolúveis (8). Dentre as últimas, foram identificadas proteínas de interesse particular, como LMW-GS codificado no *Glu-B3* locus e HMW-GS (1Ax1, 1Dx5, 1By9), proteínas fortemente associadas à qualidade da massa de trigo. Conclui-se, portanto que o método de aquisição UDMS^E foi melhor na identificação de diferentes proteínas. Devido à melhor fragmentação, este método possibilitou uma maior cobertura da sequência proteica em comparação ao método HDMS^E.

Palavras-chave: *Métodos MS^E; Proteômica de Cereais; Qualidade Tecnológica.*

ABSTRACT

Wheat is one of the most important cereals in the world for human consumption. In Brazil, research and innovation applied to the wheat production chain are very challenging. The intrinsic quality of the wheat grain is mainly determined by the quality of the gluten, which depends on the composition of the storage proteins and the polymeric profile of the glutenins. Recently, tandem mass spectrometry (MS/MS) has been applied to identify and characterize wheat proteins. However, gluten proteins have a high homology in the amino acid sequence and are particularly difficult to discriminate. In this work, proteomic tools were applied to characterize wheat proteins using two acquisition methods: high definition mass spectrometry (HDMS^E) compared with ultra-definition mass spectrometry (UDMS^E) applying simultaneous low and high energy for fragmentation and ion mobility system. Brazilian wheat flours (*Triticum aestivum*) from two varieties with contrasting technological qualities were subjected to sequential extraction, clean-up and protein digestion (LysC + Trypsin). The peptides were submitted to nanoUPLC tandem to the Synapt G2-S HDMS mass spectrometer. The data were processed in ProteinLynx Global Server v3.0 and the research was carried out in a customized database of UniProtKB 2015_03v. In the UDMS^E analyzes, an increase of 80% was observed for peptide and protein total identification. Although, on average, 3 peptides per protein were identified in both methods, peptide sequence coverage was markedly improved in UDMS^E. Analyzing fragments *b* and *y*, a

significant improvement was obtained in ions with m/z greater than 1,200 in UDMS^E. Among the accepted hits (95% probability), soluble proteins had the highest number of protein identifications (20), followed by insoluble glutenins (8). Insoluble glutenins of particular interest were identified, such as LMW-GS encoded in *Glu-B3* locus and HMW-GS (1Ax1, 1Dx5, 1By9), which are strongly associated with the quality of the wheat dough. A conclusion, it was verified that the UDMS^E acquisition method improved the protein identification due to the better fragmentation, this method allowed a greater coverage of the protein sequence compared to the HDMS^E method.

Keywords: MS^E Methods; Cereal Proteomics; Technological Quality.

1 INTRODUÇÃO

O trigo é amplamente utilizado para a produção de massas e pães por apresentar características viscoelásticas únicas (VENSEL *et al.*, 2014). No Brasil, a produção do cereal é inferior à demanda, havendo necessidade de importação para o abastecimento do país, com garantia de segurança alimentar à população. Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020) apontam que, para suprir a demanda interna, foram importadas 748,2 mil toneladas de trigo no mês de abril de 2020. A previsão de importação prevista para a safra atual é de 7,2 milhões de toneladas enquanto a produção de trigo foi de 5,4 milhões de toneladas.

Um dos principais desafios da agricultura brasileira tem sido a produção de trigo de forma competitiva e sustentável com técnicas de cultivo adequadas e obtenção de bons rendimentos e qualidade tecnológica (PIRES *et al.*, 2011). A qualidade tecnológica define a orientação industrial de uso do trigo e é determinada pela composição e distribuição de massa molecular das proteínas de reserva que formam o glúten (DHAKA; KHATKAR, 2015; PIROZI *et al.*, 2008; POPINEAU *et al.*, 1994a). No entanto, a qualidade tecnológica comercial do trigo é definida mediante testes físico-químicos (peso do hectolitro, peso de mil grãos, extração experimental de farinha, número de queda, etc.) e reológicos (alveografia, farinografia, etc) (AACC, 2000) e não leva em conta parâmetros primordiais que afetam a qualidade da massa como a composição proteica do glúten.

As proteínas dos cereais foram divididas por Osborne, em 1907, em quatro classes de acordo com sua solubilidade, sendo as albuminas solúveis em água, as globulinas em soluções salinas, as prolaminas (gliadinas) em soluções alcoólicas e as glutelinas (gluteninas) em ácidos ou bases diluídas (DE BRIER *et al.*, 2015). No trigo, estas duas últimas são classificadas como proteínas de reserva ou do glúten. Sabe-se que a distribuição da massa molecular dos polímeros das proteínas de reserva e, principalmente, as frações poliméricas insolúveis afetam positivamente a viscoelasticidade do glúten e, portanto, são os principais contribuintes do potencial tecnológico do trigo (DELCOUR *et al.*, 2012; NAEEM; MACRITCHIE, 2005; POPINEAU *et al.*, 1994b).

A caracterização e análise destas proteínas é fundamental para melhor compreensão da qualidade do trigo sendo necessária a utilização de técnicas avançadas

que permitam elucidar a composição proteica a partir de técnicas sensíveis e confiáveis. A abordagem proteômica como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é capaz de separar até mesmo peptídeos de mesma *m/z* (i.e. sistema de mobilidade iônica) (WANG *et al.*, 2013) e revelam-se como importantes ferramentas para a quantificação e identificação das proteínas do trigo (MARTINEZ-ESTESO *et al.*, 2016). Recentemente, essa abordagem foi aplicada para revelar a expressão diferencial de proteínas metabólicas (albuminas e globulinas) em farinhas de trigo de diferentes qualidades tecnológicas (VICTORIO *et al.*, 2018), bem como para decifrar peptídeos ligados à alergenicidade do trigo (ALVES *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2018) utilizando métodos MS^E (espectrometria de massas multiplexada sequencial).

Os métodos MS^E são estratégias de aquisição independente de dados (em inglês, DIA). Os íons gerados na fonte são transmitidos até a célula de colisão, que alterna entre baixa e alta energia, enviando alternadamente precursores e fragmentos ao analisador. Dessa forma, são obtidos resultados mais abrangentes e reproduutíveis porque ocorre a fragmentação simultânea de múltiplos íons precursores, independentemente da intensidade ou de outra característica (CHAPMAN *et al.*, 2014; DISTLER *et al.*, 2014; GEROMANOS *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2017). O método de alta definição denominado *High Definition MS^E* (HDMS^E) é o método MS^E acrescido do sistema de mobilidade iônica (em inglês, IMS). Neste método há uma dimensão adicional de separação, visto que os íons são separados, de acordo com sua mobilidade, em gás inerte, baseados na carga, massa, forma e tamanho. Assim sendo, são reduzidas as interferências e há uma melhora na capacidade máxima do sistema (RÍOS-CASTRO *et al.*, 2020). A fragmentação ocorre depois do sistema IMS aumentando a seletividade do alinhamento dos precursores com seus produtos. O método de ultra definição, conhecido como *Ultra Definition MS^E* (UDMS^E), é um método otimizado no qual é feita uma rampa de energia de colisão de acordo com os dados obtidos na IMS (energia de colisão específica para o tempo de aceleração). Dessa forma, a eficiência de fragmentação é melhorada, aumentando a intensidade de desempenho MS/MS para sequenciamento de peptídeos (DISTLER *et al.*, 2014; DISTLER *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017).

Dentro deste contexto, esse trabalho teve por objetivo comparar os resultados obtidos da análise por cromatografia líquida de ultra performance e espectrometria de

massas, pelos métodos HDMS^E e UDMSE utilizando dois cultivares de farinha de trigo brasileiro de qualidade tecnológica contrastantes. Com isso, almeja-se evidenciar informações relevantes que permitam a melhor compreensão da qualidade tecnológica de farinhas de trigo, com impacto positivo na cadeia produtiva do cereal.

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAL VEGETAL

As amostras de farinha de dois cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) foram cedidas pela empresa OR Melhoramento de Sementes Ltda de Passo Fundo-RS. As cultivares foram provenientes da safra 2014/2015 e tiveram colheita e manejo normal de sementes. As amostras possuem qualidades contrastantes: Campeiro (amostra 1), de classificação fraca e Ametista (amostra 4), de classificação forte. A classificação foi baseada na análise da força do glúten e da estabilidade. Esta classificação é norteada pelos métodos da AACC (American Association of Cereal Chemists) e pela Instrução Normativa MAPA 38/2010, que utilizam a determinação da força do glúten (J) pelo método de Alveografia, utilizando como parâmetros tenacidade (P), extensibilidade (L), enquanto que a estabilidade é medida em farinógrafo, conforme dados na tabela apresentada abaixo (Tabela 1). As amostras foram armazenadas em recipientes herméticos a -20°C até o momento das análises.

2.2 REAGENTES QUÍMICOS

Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) (PubChem CID: 14013), β -mercaptoetanol (PubChem CID: 1567), albumina de soro bovino (BSA) (PubChem CID: 16132389), reagente de Bradford (p/n B6916 Sigma-Aldrich), 1,4-ditiotreitol (DTT) (PubChem CID: 19001), iodoacetamida (IAM) (PubChem CID: 3727), dodecil sulfato de sódio (SDS) (PubChem CID: 3423265), Tris-HCl (PubChem CID: 93573), ácido trifluoroacético (TFA) (PubChem CID: 6422), bem como acetonitrila (PubChem CID: 6342) e ácido fórmico (PubChem CID: 284) para LC-MS foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Surfactante RapiGest (p/n 186002118 Waters) e [Glu1] -Fibrinopeptídeo B humano (GFP) (PubChem CID: 16172403) foram adquiridos de Waters Corp. (Milford, MA), enquanto

tripsina/Lys-C (p/n V5071) de grau de espectrometria de massas para a digestão enzimática foram compradas da Promega Corporation (Madison, WI).

2.3 ALQUILAÇÃO E EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DAS PROTEÍNAS DE FARINHA DE TRIGO

A extração sequencial foi realizada considerando a solubilidade das proteínas segundo a classificação de Osborne (1907) com obtenção de 4 extratos: albuminas e globulinas (A/G -solúveis em Tris-HCl), gliadinas (Gli - etanol 70%), gluteninas solúveis (GS - 2% SDS) e gluteninas insolúveis (GI - 2% SDS, 20 mM DTT). Os procedimentos foram realizados de acordo com Ferreira et al. (2014), onde foram pesados 100 mg de cada amostra (balança Shimadzu AUX220) em tubos eppendorfs identificados (1,5 mL, Axygen) e acrescentou-se 1 mL de tampão de 80 mM Tris-HCl pH 8 contendo 40 mM de iodoacetamida (IAM). As amostras foram homogeneizadas em vortex, agitadas em shaker (60 minutos; 200 rpm; 25 °C; Incubadora TE-420 Tecnal) e centrifugadas (10.600 xg; 10 min; 20°C; centrífuga refrigerada Megafuge 16R Centrifuge, Thermo). Os extratos contendo A/G foram obtidos a partir de 650 µL recolhidos de cada sobrenadante e congelados a -20 °C. O restante dos sobrenadantes foi descartado e os pellets ressuspensos em 1 mL de etanol 70% (preparado com água com grau de pureza LC-MS). As amostras foram homogeneizadas (15 min; 200 rpm; 25 °C) e centrifugadas (10.600 x g; 20 min; 20 °C). Os extratos contendo Gli foram obtidos a partir de 650 µL recolhidos de cada sobrenadante e congelados a -20 °C. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de 80 mM Tris-HCl (pH 8) com 2% SDS, homogeneizados (200 rpm; 60 min; 24,7 °C) e centrifugados (10.600 x g; 20 min; 20 °C). Para obtenção dos extratos GS, realizou-se o mesmo procedimento feito para os demais. Os pellets finais foram então ressuspensos em 750 µL de 80 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mMditiotreitol (DTT) e 2% SDS, colocados em banho-maria (30 min; 60 °C; ALB 250 C Loja Lab), submetidos à sonicação com ponteira (15 s, 20% potência; Eco-Sonics; 500 Watts) e centrifugados (10.600 x g; 20 min; 20 °C). Os extratos GI foram obtidos como os demais e armazenados a -20 °C. Todas as etapas foram realizadas sob proteção da luz.

2.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). Albumina de soro bovino (BSA) foi usada para a curva padrão, partindo da concentração de 2 mg/mL com diluições seriadas até a concentração final de 0,0625 mg/mL. As curvas padrões foram consideradas quando o R^2 foi superior a 0,98. Os extratos de proteínas foram diluídos uma vez em água e 20 μ L de amostra ou de BSA foram pipetados em eppendorf acrescentando-se 1 mL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich). O tempo de reação foi de 5 min sob proteção da luz. As leituras foram realizadas em triplicata a 595 nm em espectrofotômetro (UV-2700, Shimadzu). Para verificação, a etapa de quantificação proteica foi realizada antes e depois da etapa de *clean-up*.

Tabela. 1. Caracterização da qualidade tecnológica de duas cultivares de trigo brasileiro, segundo parâmetros reológicos e físico-químicos.

Cultivares	Qualidade	Classificação	Força do glúten (J)	Estabilidad e (min)	Númer o de queda	Tenacidad e (mm)	Extensibilidad e (mm)	Absorção de água (%)
CAMPEIRO	Doméstico	Fraca	119,25	7,25	291	32	152	49
AMETISTA	Pão/ Melhorador	Forte	352,7	17	325,5	117	87	67,5

2.5 ETAPA DE LAVAGEM (CLEAN-UP)

Foram utilizados filtros Amicon 3 kDa (Ultra Centrifugal Filters, Millipore) previamente lavados com 500 µL de água LC-MS e centrifugados (14.000 xg; 30 min; 4 °C). Após descongelamento, as amostras foram centrifugadas (10.000 xg; 10 min; 4 °C) e os filtros Amicon foram centrifugados invertidos para retirada da água (1.000 xg; 2 min; 4 °C). Então, 500 µL de amostra foram colocados no filtro e centrifugados (14.000 xg; 30 min; 4 °C). Foram realizadas duas lavagens com 500 µL bicarbonato de amônio (50 mM; pH 8,5) e posterior centrifugação (14.000 xg; 60 min; 4 °C). Para recuperar o retido, os filtros foram invertidos em novos tubos e centrifugados (1.000 xg; 2 min; 4 °C). O volume recuperado aproximado de cada amostra foi anotado e as amostras foram diluídas em bicarbonato de amônio até atingirem concentração aproximada de 1 µg/µL.

2.6 DIGESTÃO TRÍPTICA

Uma alíquota de 50 µL de cada extrato proteico com concentração aproximada de 1 µg/µL foi colocada em eppendorf e foram adicionados 10 µL de 50 mM bicarbonato de amônio pH 8,5 e 25 µL de solução 0,2% v/v RapiGest SF (Waters). As amostras foram homogeneizadas, colocadas em banho-maria (15 min; 80 °C) e centrifugadas (14.000 x g; 10 min; 4 °C). Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de 100 mM DTT (50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5) e, novamente, as amostras foram homogeneizadas, colocadas em banho-maria (30 min; 60 °C) e centrifugadas (14.000 x g; 10 min; 4 °C). Após adição de 2,5 µL de 300 mM iodoacetamida (50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5) as amostras foram vortexadas e deixadas no escuro (20 °C, 30 min). Foram adicionados 20 µL de Tripsina Lys-C (Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spectrometry Grade, Promega) preparada em 50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5 e homogeneizou-se. A etapa de digestão foi feita em *overnight* em shaker (14 horas; sem agitação; 37 °C). Após o *overnight*, foram adicionados 10 µL de 5% ácido trifluoroacético, seguindo com incubação em shaker (90 min; sem agitação; 37°C) e centrifugação (14.000 x g; 30 min; 4 °C). Os sobrenadantes foram transferidos para eppendorf de 600 µL e armazenados em ultrafreezer.

2.7 AQUISIÇÃO EM 1D NANOUPLC-MS^E

Aos *vials* (*total recovery*, Waters) foram adicionados 5 µL de hidróxido de amônio (NH₄OH, 1N) e quantidades diferentes de amostra e formiato de amônio a 20mM (NH₄FO). Assim sendo, em cada *vial* obteve-se uma concentração aproximada de proteínas de 733 ng/ µL. Para as amostras de GLI, o volume final no *vial* foi de aproximadamente 135-140 µL, 100 µL de amostra e 30-35 µL de 20mM NH₄FO. Para as demais amostras o volume final no *vial* foi de 150 µL, sendo 110 µL de amostra e 35 µL de 20mM NH₄FO.

A separação em NanoUPLC dos peptídeos tripsinizados foi realizada usando um sistema 1D simulado nanoACQUITY UPLC (Waters) equipado com uma pré coluna Xbridge™ BEH130 C₁₈ (5 µm, 300 µm x 50 mm, Waters), coluna Trap 2G nanoAquity UPLC C₁₈ (5µm, Waters) e coluna de fase reversa nanoAquity BEH130 C₁₈ (1,7 µm, 100 µm x 100 mm, Waters). A coluna foi acondicionada com os seguintes parâmetros: capilar (2,7 kV), *sample cone* (30 V), *source offset* (30 V), temperatura (70 °C), variação de *m/z* de 50 a 2000 e tempo de varredura de 0,5 s. Acoplado ao NanoUPLC utilizou-se o sistema de espectrometria de massas do instrumento Synapt G2-S HDMS (Waters) com quadrupolo, mobilidade iônica e tempo de voo (*time-of-flight* - TOF). Todas as análises foram realizadas em modo resolução com nanoElectrospray em modo positivo (nanoESI+). O analisador de TOF foi externamente calibrado com solução equimolar de Leu-Enk (Leucina Encefalina) e GFP (Glu1-fibrinopeptídeo B) de 200 fmol.L⁻¹. A relação *m/z* do GFP usada na calibração foi de 785,8426 (*LockMass*) e da Leu-Enk foi de 556,2771 para cálculo de VEFF. *Lock spray source setup* foi realizado com GFP.

2.8 ETAPA DE SCOUTING RUN

Para cada amostra foram realizadas corridas de prospecção (*scouting run*) objetivando normalizar a área total dos picos obtidos de proteínas totais injetadas na coluna, bem como a quantidade de proteínas a ser injetada no instrumento. Foram injetados 4 µL de cada amostra com vazão de 500 nL.s⁻¹ segundo em sistema 1D simulado, numa coluna de 100 µm x 100 mm. O método utilizado foi o MS^E (modo de aquisição contínuo com aplicação simultânea de baixa e alta energia na célula de colisão), 29 minutos de corrida em modo “resolution” e polaridade positiva. Foram

adquiridos íons com massa entre 50 e 2.000 Da, com tempo de varredura de 0,5 segundos, em modo de dados contínuo, rampa de colisão de energia de 15 a 53 V e voltagem do cone de 30 V. As amostras correram por 29 minutos com gradiente das fases com gradiente de 3 a 45 % de fase móvel B na primeira dimensão com fluxo de 2.000 nL.min⁻¹. Na segunda dimensão o fluxo foi de 500 nL.min⁻¹ com gradiente de 7 a 85% de fase móvel B. A fase móvel A era constituída de água ultra-pura (grau LC-MS) com 0,1% de ácido fórmico e a B de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. A coluna foi reequilibrada até as condições iniciais e a temperatura da coluna foi mantida em 55 °C. A solução *Lock Mass* foi oriunda da bomba B (ASM) com fluxo constante de 200 nL.min⁻¹ e limite superior de pressão de 10.000 psi.

2.9 MÉTODOS HDMS^E E UDMS^E

Após as aquisições de *scouting run*, as amostras foram adquiridas pelo método multiplexado de análise MS/MS HDMS^E injetando 4 µL, onde os peptídeos foram analisados com sistema de mobilidade iônica seguidos de aplicação simultânea de baixa e alta energia de fragmentação. A aquisição foi de 0 a 29 minutos em modo “*resolution*”, polaridade positiva, com íons de massa entre 50 e 2.000 Da. O tempo de varredura foi de 0,5 segundos, rampa de transferência e colisão de energia de 19 a 45 V e voltagem do cone de 30 V. Os espectros gerados após a aquisição pelo método HDMS^E foram processados no programa DriftScope (Waters) (Figura 1). A seleção da área a ser utilizada na aquisição por UDMS^E foi padronizada para todas as amostras com os seguintes critérios: a linha inferior da área seleciona partiu do ponto zero e foi até a marca intercessora entre *drift time* 200 (eixo x) e relação massa/carga (*m/z*) 1850 *m/z*(eixo y) e a linha superior iniciou em *drift time* 0 e 50 *m/z* e terminou em *drift time* 68 e 2000 *m/z*. Esse método objetivou a retirada da faixa de sinais intensos correspondentes aos íons monoprotonados, não característicos em ESI.

Após o tratamento dos espectros obtidos por HDMS^E, foi então realizado o método UDMS^E com injeção de 4 µL em triplicata, onde o instrumento selecionou apenas íons com 2 ou mais cargas para serem fragmentados e analisados. A aquisição foi de 29 minutos em modo *resolution*, polaridade positiva, com íons de massa entre 50 e 2.000 Da e voltagem do cone de 30 V.

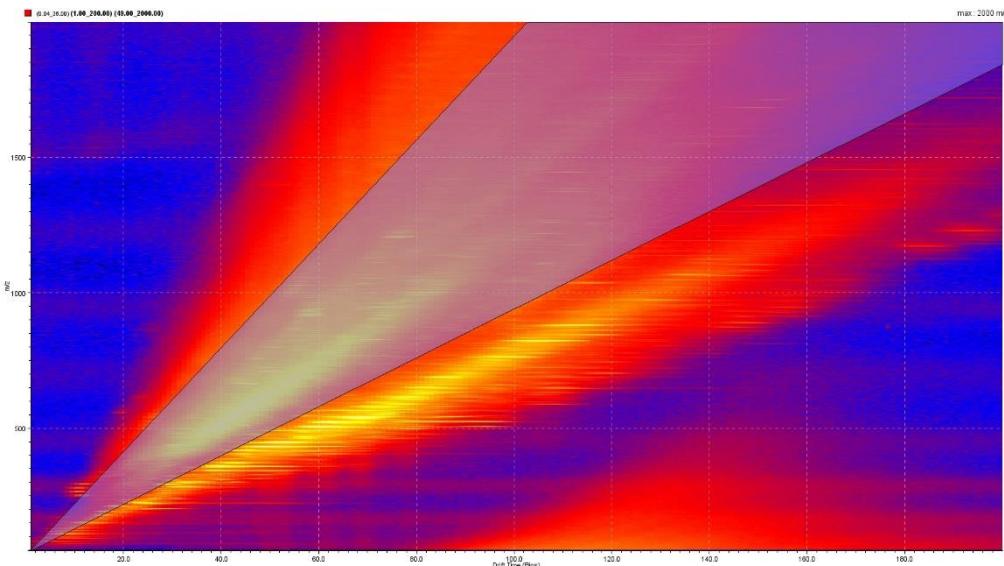


Figura. 1. Exemplo de espectro obtido por HDMS^E processados no programa DriftScope.

2.10 PROCESSAMENTO DE DADOS

Para identificação e quantificação de peptídeos e proteínas foi utilizado o *software Progenesis QI for Proteomics* (v 2.1 NonLinearDynamics, Waters), alimentado com o banco de dados de proteínas de *Triticum aestivum* do UNIPROT KB release 2015-10, publicado em 14.10.2015 (UNIPROT). A taxa de falsos positivos (*false discovery rate - FDR*) permitida foi menor que 4%, e para combinação de íons foram estipulados um ou mais fragmentos por peptídeo, três ou mais fragmentos por proteína e um ou mais peptídeos por proteína. Para a identificação de proteínas, a exatidão de massa aplicada foi inferior a 10 ppm e score maior que 3. As análises foram baseadas em quantificação sem marcadores químicos ou derivatizantes (*label free*). Para cada espectro de fragmentação gerado por MS/MS, o software usa um algoritmo padrão estabelecido com 14 diferentes propriedades físico-químicas para confirmar a proteína e a identidade de seus peptídeos relacionados. Para comparação dos dados obtidos por HDMS^E e UDMS^E o software utilizado foi o ProteinLynx Global Server v3.0, onde os íons moleculares precursores foram associados com os fragmentos para identificação de proteínas com base em seu tempo de retenção de massa exata (EMRT), bem como o *drift time*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise dos extratos sequenciais foram realizadas as corridas de prospecção para análise da área total dos picos e cálculo da injeção do volume de amostra. Esse procedimento é importante porque permite que as condições sejam comparadas umas às outras. As aquisições foram feitas com injeção do volume máximo permitido para o *loop* utilizado de 4 µL (Figura 2).

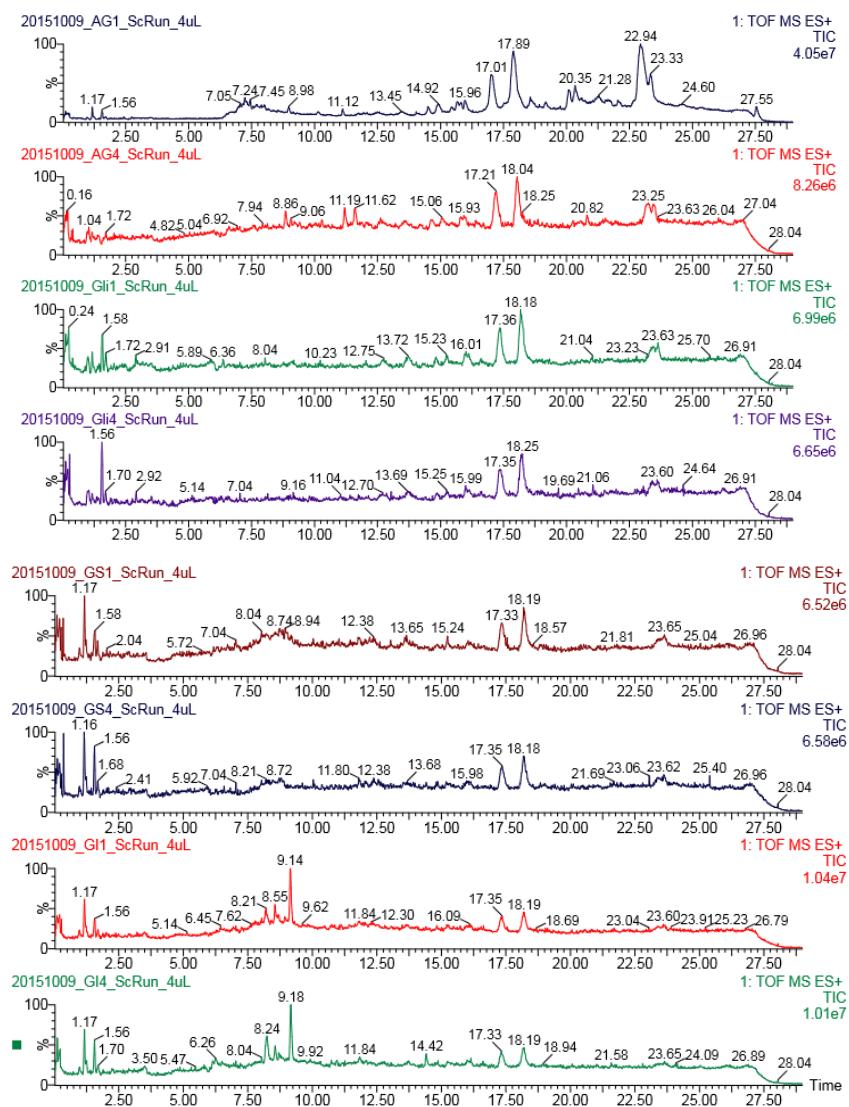


Figura. 2. Cromatogramas das corridas de prospecção (*scouting run*) dos extratos sequenciais (AG, Gli, GS e GI) das amostras Campeiro e Ametista em TIC (*total ion count*).

Em seguida, os extratos foram adquiridos no método HDMS^E, utilizando o sistema de mobilidade iônica através da técnica de *Travelling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry* (TWIM-MS) que é uma separação ortogonal, onde uma nova dimensão é adicionada aos dados conferindo para cada valor de *m/z* um espectro de *drift time*¹, separando os íons pelas suas seções de choque (MICHAELEVSKI *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2017). Assim, os íons são diferenciados por tamanho, forma e carga, além da massa. Nos cromatogramas obtidos por meio do método de HDMS^E (Figura 3) foram detectados picos majoritários (TR 17-18,31 min, 23,42 min), presentes em todas as amostras analisadas. A análise dos espectros obtidos mostrou que esses picos correspondem a compostos monoprotonados e alguns foram identificados como contaminantes (*i.e.* polímeros oriundos do capilar usado na fonte NanoESI). Somado a isto, sabe-se que peptídeos se apresentam multicarregados principalmente quando obtidos em fontes do tipo ESI. A partir disso, foi utilizado o software DriftScope (Waters) que utiliza os dados de *drift time*, permitindo a detecção e separação de interferentes dos demais componentes de interesse em misturas complexas. Foram então selecionados apenas íons com 2 ou mais cargas para serem fragmentados e analisados, conforme exemplo da Figura 1.

Nos cromatogramas obtidos por meio do método de UDMS^E (Figura 4) é possível observar, claramente, a melhora dos sinais obtidos com este método. Os dados obtidos nas aquisições em modo HDMS^E e UDMS^E foram processados no PLGS e comparados entre si, sendo apresentados os espectros obtidos pelo método UMDS^E (Figuras 5 para AG e Gli e Figura 6 para GS e GI).

¹*Drift time* (dt) é medido em milissegundos e corresponde ao tempo que íon leva para atravessar a cela de mobilidade iônica onde é inserido o gás inerte, no caso o hélio (He) .

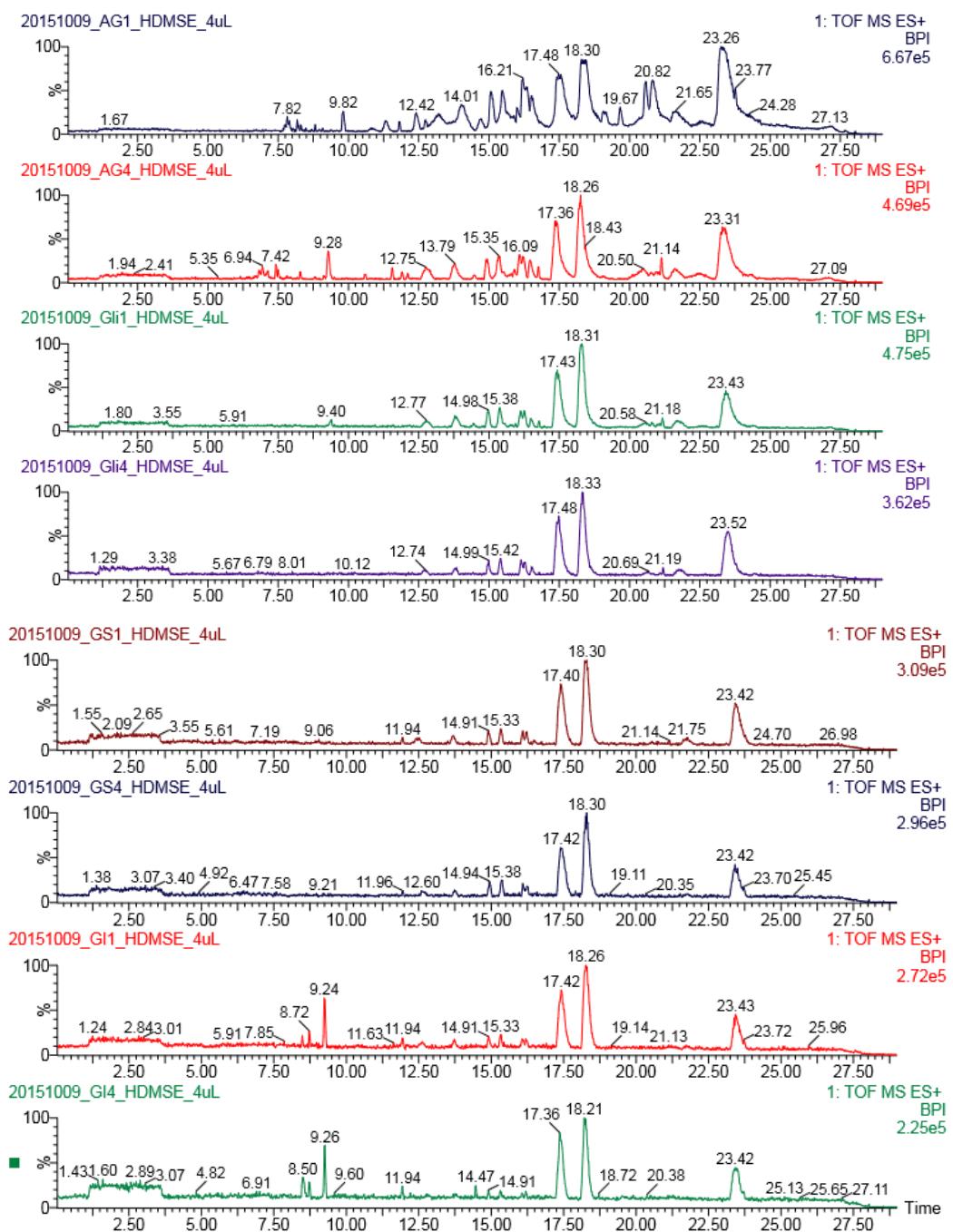


Figura. 3. Cromatogramas das aquisições por HDMS^E dos extratos sequenciais (AG, Gli, GS e GI) das amostras Campeiro e Ametista em BPI (*base peak intention*).

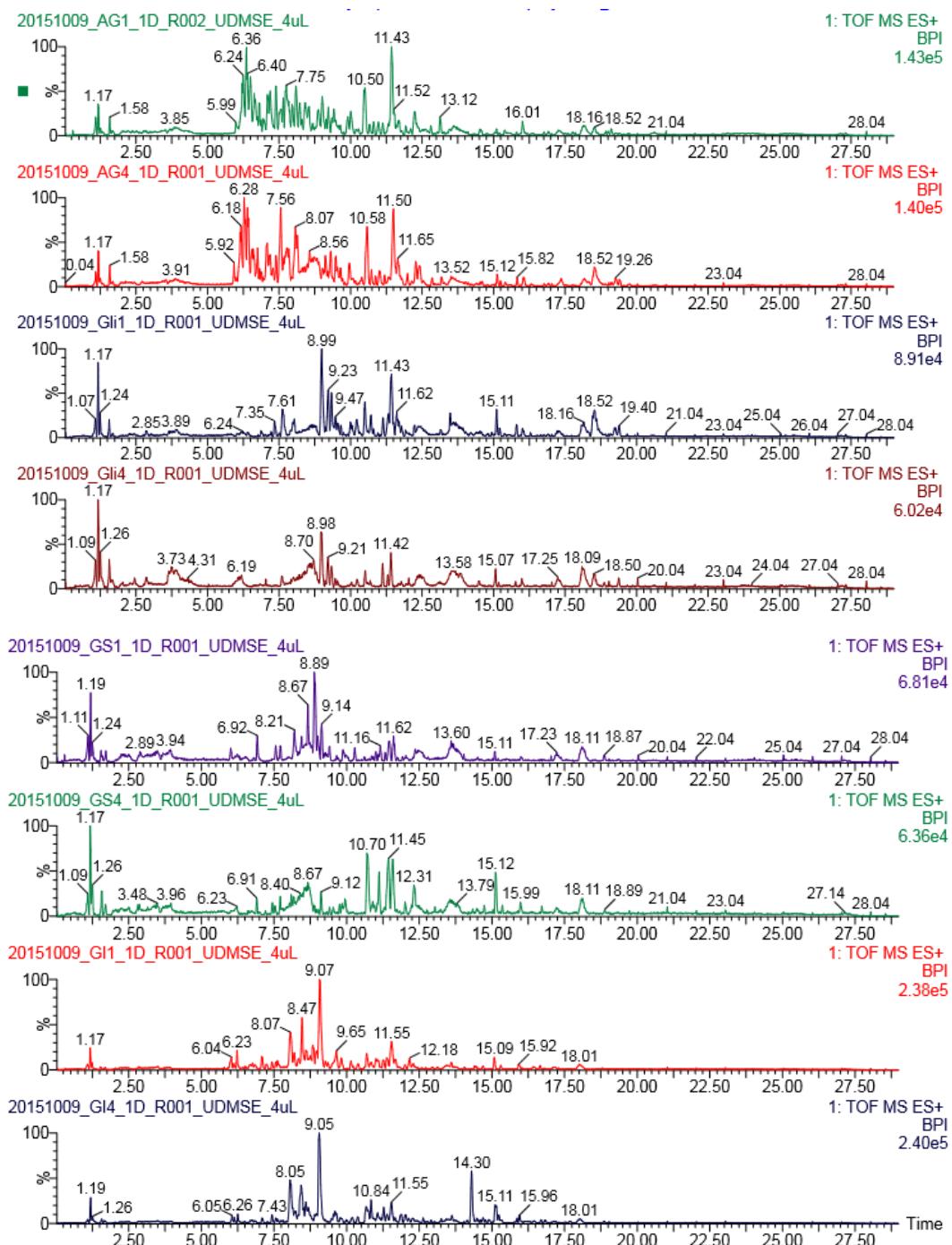


Figura. 4. Cromatogramas das aquisições por UDMSE dos extratos sequenciais (AG, Gli, GS e GI) das amostras Campeiro e Ametista em BPI (*base peak intention*).

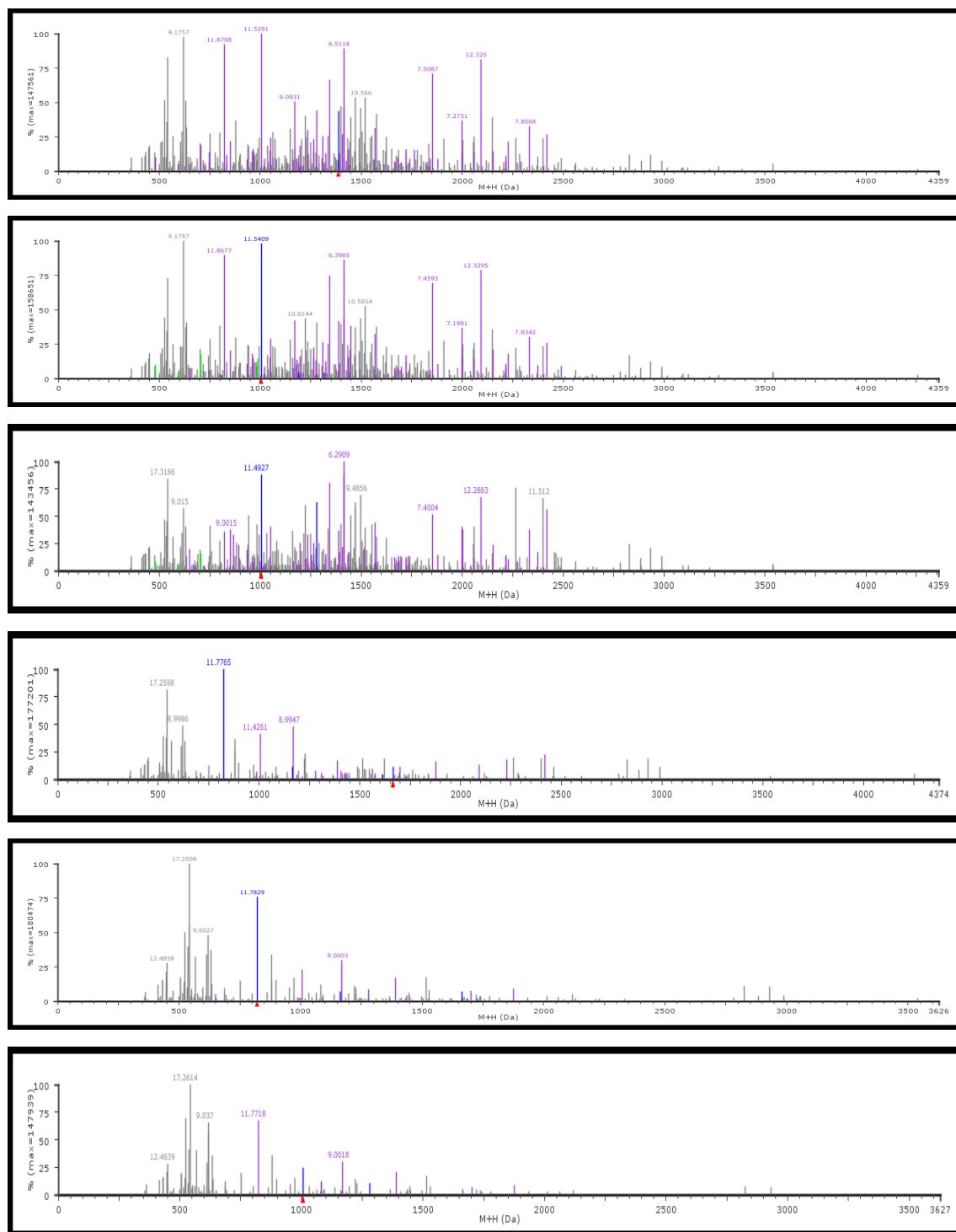


Figura. 5. Espectros UDMS^E das aquisições em triplicata dos extratos AG1 (superiores) e Gli1 (inferiores), em roxo os peptídeos associados à identificação de proteínas.

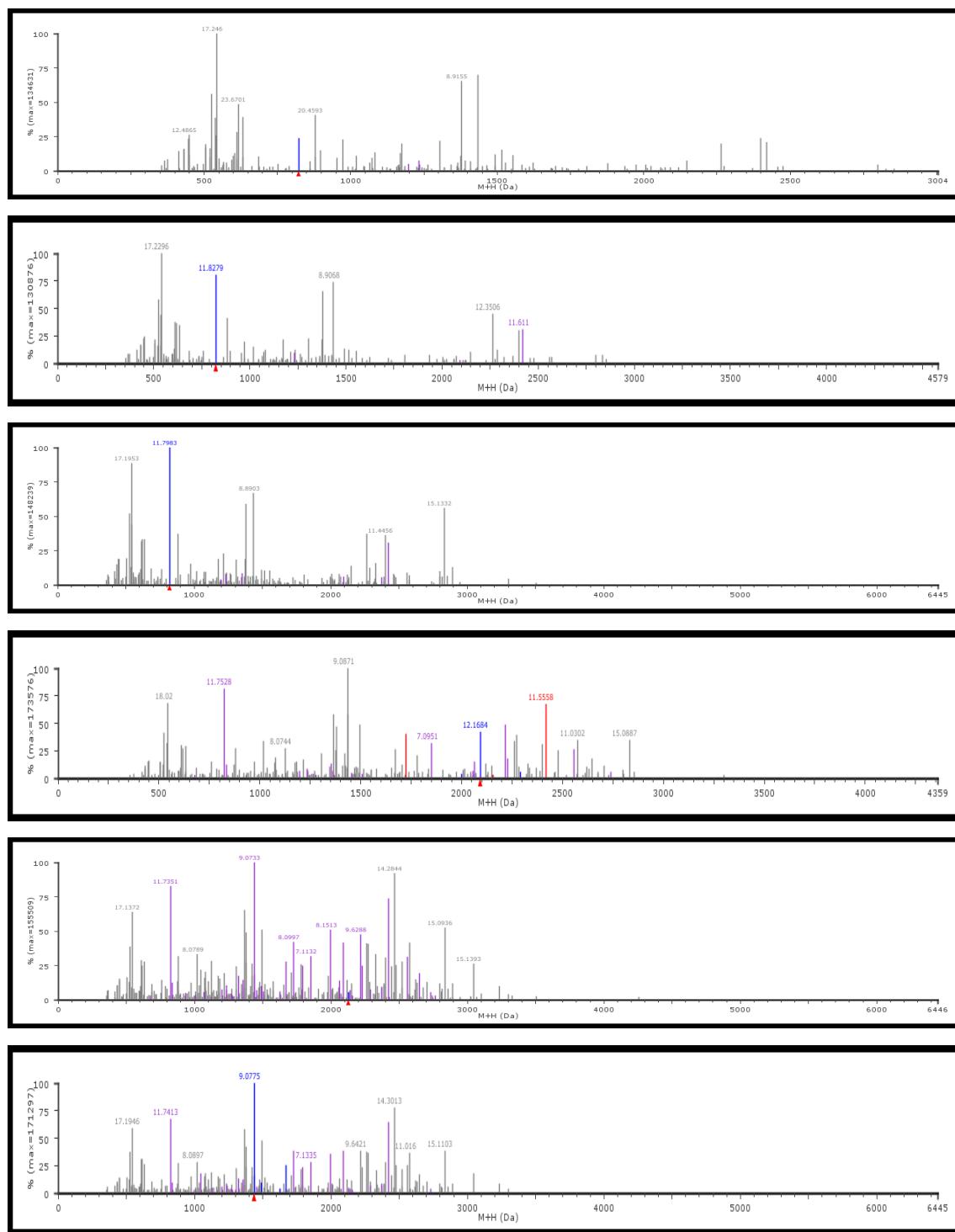


Figura. 6. Espectros UDMS^E das aquisições em triplicata dos extratos GS1 (superiores) e GI1 (inferiores), em roxo os peptídeos associados à identificação de proteínas.

Comparou-se o número de proteínas e de peptídeos identificados para todos os extratos analisados (AG, Gli, GS e GI) das duas variedades estudadas em ambos os métodos HDMSE e UDMSE^E, sendo neste último considerada a média das triplicatas (Figura 7). Houve um aumento significativo do número de peptídeos e proteínas identificadas pelo método UDMSE^E, principalmente nos extratos AGs e Gls. O maior número de identificação de proteínas ocorreu nos extratos de proteínas solúveis (albuminas e globulinas), seguido dos extratos de gluteninas insolúveis. Quando apenas os dados de peptídeos e proteínas identificadas com intervalo de confiança acima de 95% foram considerados, observou-se um aumento de aproximadamente 60% nas análises UDMSE^E (Figura 8).

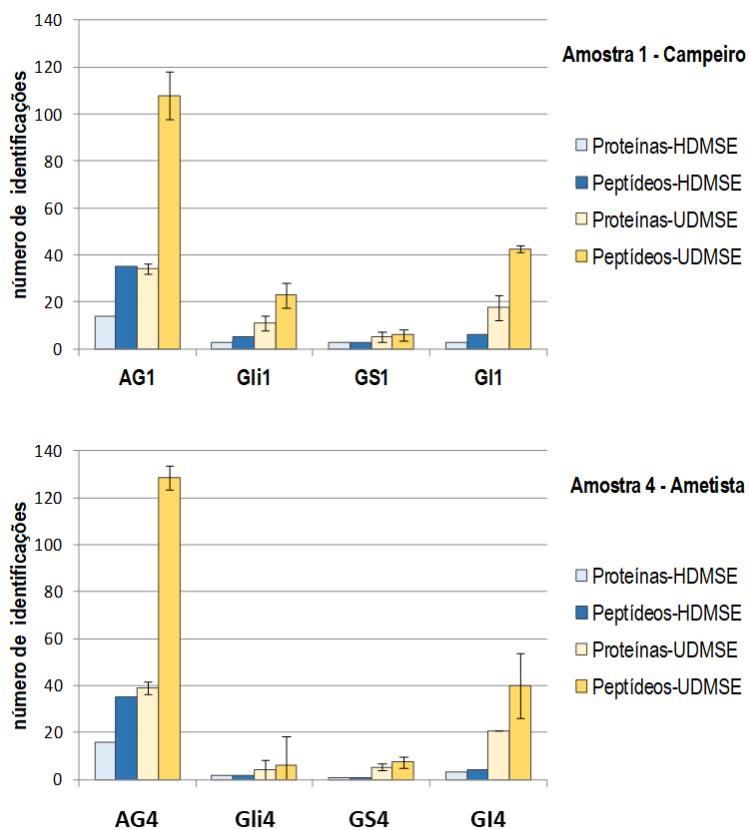


Figura. 7. Comparação do número de identificações de peptídeos e proteínas em HDMSE e UDMSE^E nos extratos Albuminas/Globulinas (AG), Gliadinas (Gli), Gluteninas Solúveis (GS) e Gluteninas Insolúveis (GI).

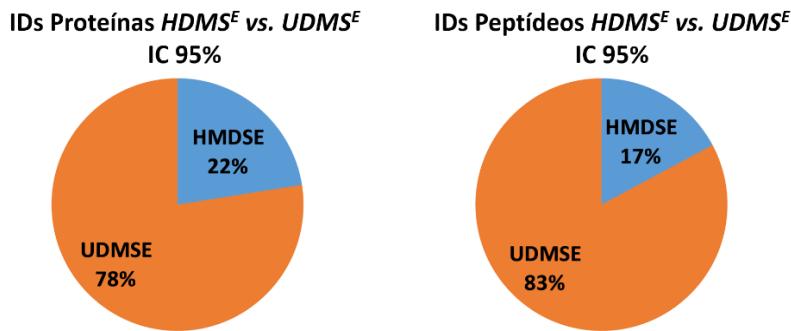


Figura. 8. Comparação do número total de identificações de proteínas e peptídeos identificados com intervalo de confiança (IC) acima de 95%, em HDMS^E e UDMS^E.

Foi realizada análise detalhada dos fragmentos *b* e *y* obtidos pelos métodos HMDS^E e UDMS^E nos extratos AG (Figura 9) e Gli, Gs e GI (Figura 10). É possível observar que houve melhora significativa da fragmentação dos precursores no método UDMS^E, principalmente em íons com *m/z* superior a 1.200. Assim como apresentado acima e também já observado desde o cromatograma e nos espectros resultantes, os extratos com maiores números de identificação são os AG e GI. Este resultado é claramente observado nas figuras abaixo que representam a distribuição de fragmentos *b* e *y* obtidos nestes extratos quando comparados HDMS^E e UDMS^E. Embora, em média o número de 3 peptídeos por proteína identificada tenha sido obtido em ambos os métodos, o que denota a confiabilidade dos resultados em ambos os métodos, o que foi determinante foi a melhora da cobertura de sequência no método UDMS^E. Assim, é possível atribuir que o aumento significativo de peptídeos e proteínas identificadas, assim como da cobertura de sequência, foi devido a uma fragmentação mais eficiente nas aquisições pelo método UDMS^E.

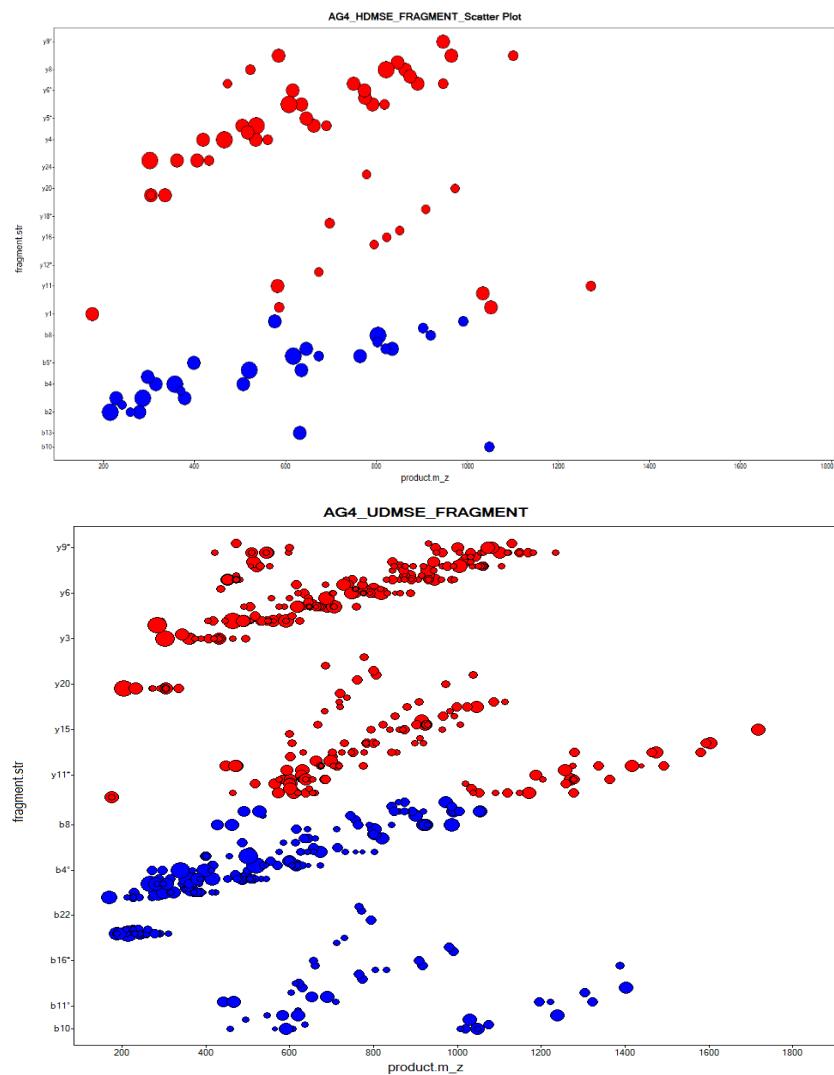


Figura. 9. Distribuição de fragmentação dos íons b (vermelho) e y (azul) obtidos nas corridas das amostras AG da variedade Ametista em HDMS^E (superior) e UDMS^E (inferior).

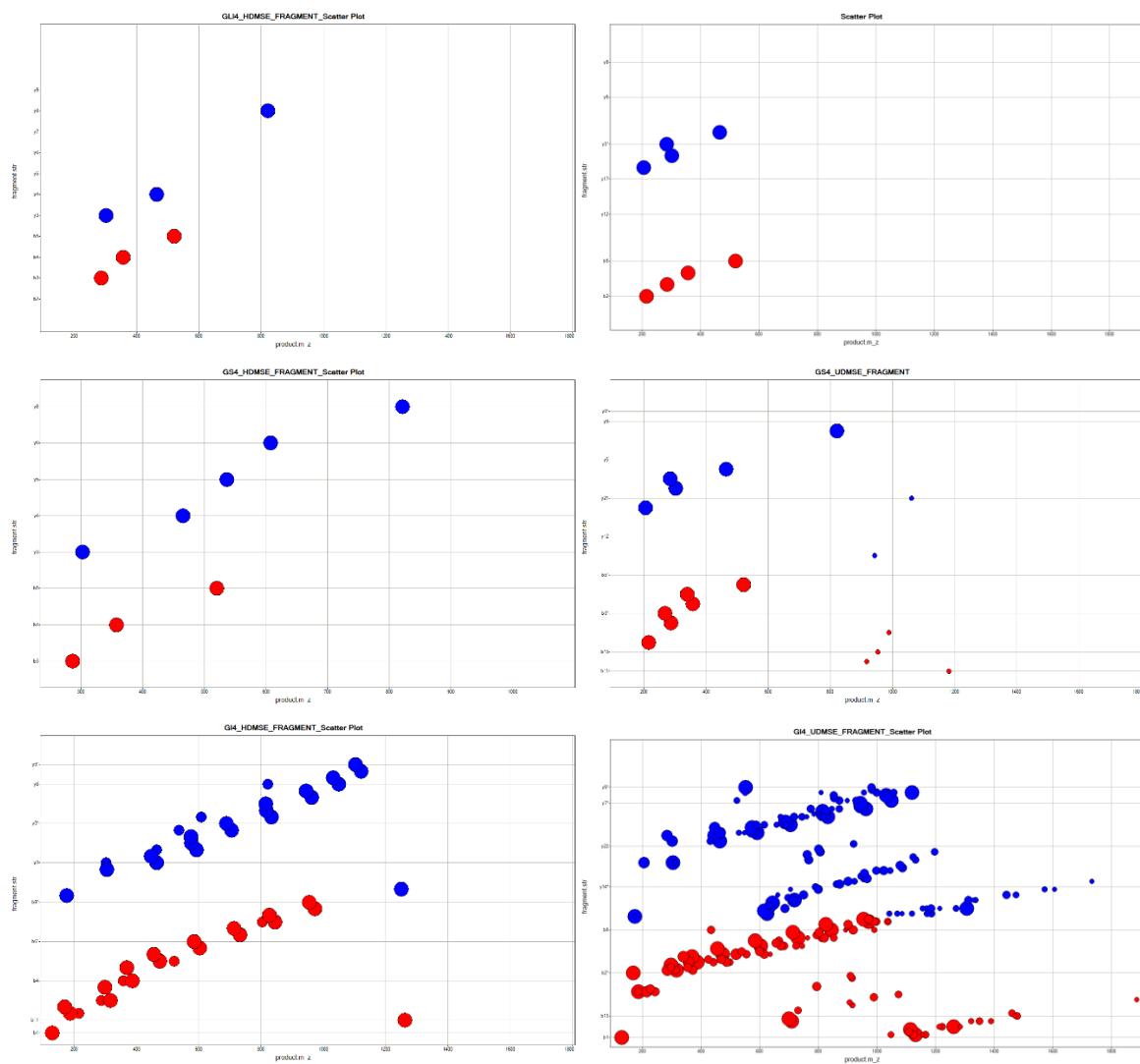


Figura. 10. Distribuição de fragmentação dos íons b (vermelho) e y (azul) obtidos nas corridas das amostras Gli (superior), GS (meio), GI (inferior) da variedade Ametista em HDMS^E (esquerda) e UDMS^E (direita).

A análise global dos dados, após identificação das proteínas realizada pelo software *Progenesis QI for Proteomics*, mostrou que um total de 1800 proteínas foram identificadas e quantificadas relativamente com uma média 3 peptídeos por proteína, entre elas, 300 proteínas foram concatenadas em todas as amostras e replicatas (Figura 11). Em relação à identificação de proteínas, 90% foram identificadas por até 6 peptídeos e 75% identificadas por até 3 peptídeos, média do experimento (Figura 12).

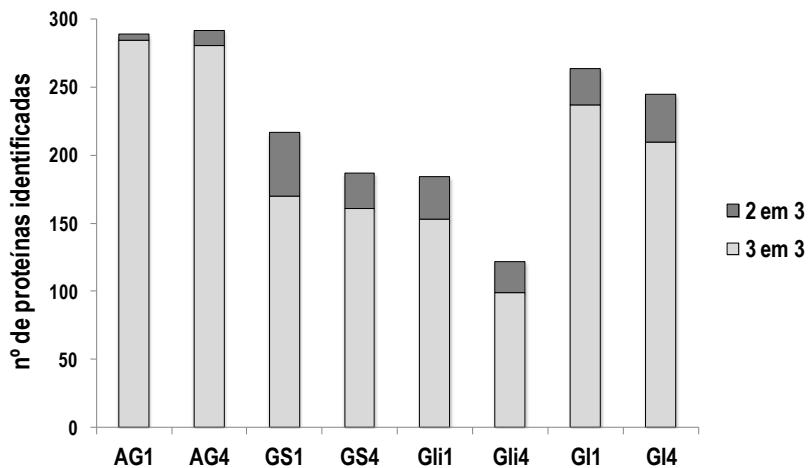


Figura. 11. Total de proteínas identificadas em conjunto em 2 de 3 replicatas e em 3 de 3 replicatas.

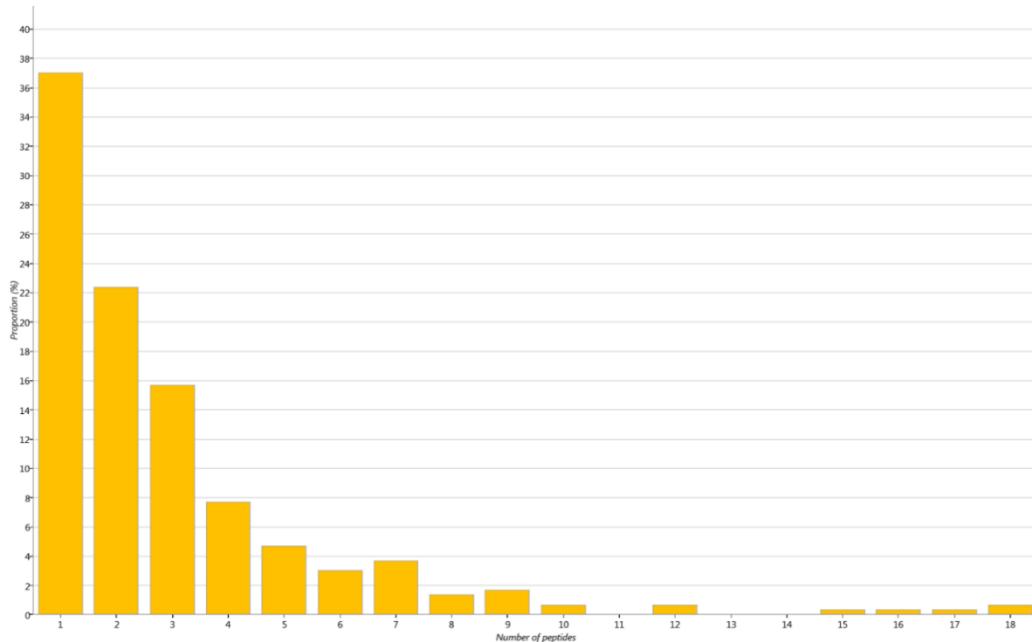


Figura. 12. Proporção (eixo y) do número de peptídeos identificados por proteína (eixo x, 1 a 18).

A relação de proteínas identificadas nos diferentes extratos para as duas amostras (1 e 4) está apresentada pelo diagrama de Venn (Figura 13) evidenciando quantas são exclusivas para cada amostra e quantas são comuns entre elas. Os extratos AG1 e 4 apresentaram 112 proteínas comuns, com uma diferença de mais de 50% de identificação na AG4, onde foram identificadas 84 exclusivamente contra 39 em AG1. Nas proteínas identificadas nas amostras Gli1 e Gli4 foram encontradas 14 proteínas comuns, sendo que nenhuma foi identificada exclusivamente em Gli4, enquanto que Gli1

possui 35 proteínas não presentes em Gli4. Em relação ao número de proteínas identificadas nos extratos GS, 27 foram comuns aos dois extratos GS1 e GS4, 9 exclusivamente identificadas em GS1 e 16 em GS4. Para os extratos GI, observou-se 66 proteínas comuns aos extratos GI1 e GI4 e 29 exclusivas à GI1 e 17 à GI4. Assim, é possível concluir que em média os extratos das proteínas solúveis apresentaram o maior número de proteínas identificadas (120), seguido das gluteninas insolúveis (58), gluteninas solúveis (25) e gliadinas (21).

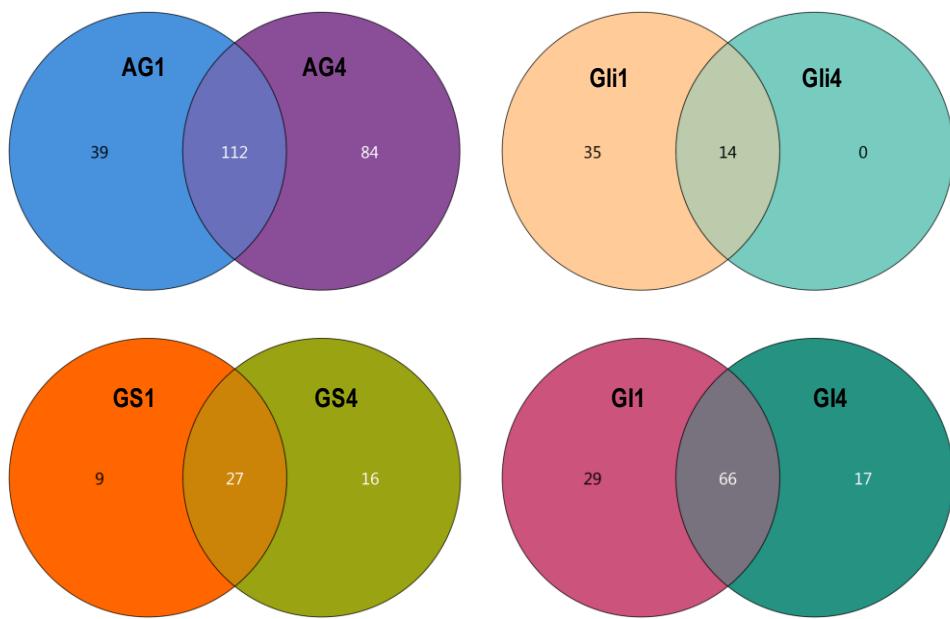


Figura. 13. Diagrama de Venn com todas as proteínas identificadas nos quatro extratos sequenciais para as duas variedades estudadas.

As principais classes de proteínas de reserva identificadas neste trabalho estão apresentadas na Tabela 2. As maiores abundâncias das proteínas identificadas foram encontradas em ambos os extratos de gluteninas insolúveis (GI1, GI4) e as proteínas mais abundantes corresponderam às subunidades de glutenina HMW. Nestes extratos, proteínas particularmente interessantes foram tentativamente identificadas, tais como subunidades de glutenina LMW codificadas no locus *Glu-B3* e subunidades de glutenina HMW (1Ax1, 1Dx2, 1Dy12, 1Dx5, 1Dy10, 1Bx7, 1By8 e 1By9), sendo que algumas delas, como a 1Ax1, 1Dx5 e 1Dy10 são fortemente associadas com variedades de trigo que apresentam alta qualidade relacionadas à força do glúten. Devido à homologia destas proteínas não foi possível discriminar a composição das subunidades das variedades 1

e 4. Este é um problema frequentemente associado na identificação das proteínas do glúten (FERREIRA *et al.*, 2014; ROMBOUTS *et al.*, 2013; VENSEL *et al.*, 2014) e requer a continuação dos estudos, principalmente no que tange a construção dos bancos de dados.

Tabela. 2. Lista das proteínas de reserva identificadas nos diferentes extratos.

Descrição UNIPROT	Número de acesso UNIPROT (descrição)	Nº peptídeos identificados	Score Progenesis (únicos)	ANOVA (p)	Extratos*
High molecular weight glutenin subunit OS=Triticum aestivum GN=glu PE=4 SV=1	A0A060MZP1, A0A059UHD1 (1Ax1), A0MZ38 (1Ax), G3K725, (1Ax1.1), Q03872 (1Ax1), Q19AE4 (A1), Q41553 (Ax2), Q8H0L2 (Ax type), Q8H0L5 (Ax type), Q9SYY0 (A1), T2HRF3 (A1)	12 (10)	92,1589	2,89E-07	AG1, GS1, Gli1, GI1 AG4, GS4, Gli4, GI4
Dy-type high molecular weight glutenin subunit OS=Triticum aestivum GN=1Dy12* PE=4 SV=1	E0W6G5 (1Dy12*), A0A0H4SMF2 (1Dy12), A0A0H4SR12 (1Dy12), A3RF25 (1By9), A3RF26 (1By9), A4URY8 (1Dy12), A9QUS3 (1Dy12), A9YSK3 (D1-2), A9ZMG8 (1Dy10), D2CPI7 (1Dy11), E4W506 (1Dy12.), P10387 (DY10), Q670Q5 (1Dy10), Q8H0L3 (Dy type), Q8H0L6 (Dy type), V9TRL3 (1Dy)	7 (2)	59,5474	0,0001116 56	AG1, GS1, GI1 AG4, GS4, GI4

Descrição UNIPROT	Número de acesso UNIPROT (descrição)	Nº peptídeos identificados	Score Progenesis (únicos)	ANOVA (p)	Extratos*
HMW glutenin subunit 1By9 OS=Triticum aestivum GN=Glu-1By9 PE=4 SV=1	Q03871 (1By9), A0A023GQG9 (Y-type), A0A060AER5 (1By15), A5HMG2 (1By16), B8PSA6 (1By15), Q0Q5D8 (By8), Q4JHY1 (1By15), Q7X6E6 (A1-2), Q7X6P9 (A1-2), Q7X8H1 (A1-2), Q7XZA5 (A1-2), Q7XZB4 (A1-2), Q7XZB8 (A1-2), U5YQV1 (By18), W0C8U3 (1By15)	7 (2)	71,3586	0,0030110	AG1, GS1, Gli1, GI1 AG4, GS4, Gli4, GI4
High-molecular-weight glutenin subunit Bx17 OS=Triticum aestivum GN=Glu-B1 PE=4 SV=1	Q18MZ6 (Bx17), A9YSK5 (B1-1), G4Y3Y0 (Bx7.1) G4Y3Y1 (Bx7.2), Q42451 (B1-1b), Q45R38 (Bx7)	2 (1)	13,0559	0,0002485	AG1, 42 GS1, GI1 AG4, GS4, GI4
1Bx high molecular weight	Q1KL95 (1Bx), Q7X6V6 (B1-1), Q7XAG6 (B1-1), 3 (1) Q7XAG7 (B1-1), Q7XAH0 (B1-1), Q7XAH2 (B1-1),	3 (1)	14,9456	5,85E-08	GI1 GI4

Descrição UNIPROT	Número de acesso UNIPROT (descrição)	Nº peptídeos identificados	Score Progenesis (únicos)	ANOVA (p)	Extratos*
glutenin subunit OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	Q7XAH9 (B1-1), Q7XAJ1 (B1-1), Q8H0L4 (Bx TYPE), W0C8N8 (1BX14)				
HMW glutenin subunit OS=Triticum aestivum GN=1Dx2.2 PE=4 SV=1	Q8GV12 (1Dx2.2), A0A0H4PMT1 (1Dx2.1t), A9YSK4 (D1-1), B1B520 (D1), C0SUC3 (1DX5), D0IQ05 (DX5), D0IQ07 (DX2), D7REK2 (1DX5), E2CT66 (1DX1.5*), G1E6K7 (Dx5), J7G6L4 (1Dx2.2), Q0Q5D2 (X-type), Q1KL96 (1Dx), P10388 (DX5), Q38LF5 (DX5), Q599I0 (1Dx2.2*), Q6R2V1 (1Dx2.1), X2JUA0 (Dx5)	3 (2)	33,0704	1,95E-06	GI1 GI4
Low molecular weight glutenin OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	C0KK80;A2IBV6;C0KK81;C0KK82;D0EVN9;D0EVP5; D7RFI3;F4YT78;F5A654;F8SGP0;F8SGP3;H6VLP8;H 6VLQ1;H6VLQ2;H6VLQ5;I3XHP8;I3XHP9;I3XHQ1;I3X HQ3;K7WV92;P04730;P10386;P93791;P94021;Q00M 59;Q0GNG0;Q0GQX0;Q0PW08;Q30DX5;Q30DX7;Q5 2NZ3;Q52NZ5;Q52NZ6;Q7DM83;R4JFK6;R9XUE1;R9	5 (2)	28,8791	9,06E-06	AG1, GS1, Gli1, GI1 AG4, GS4, Gli4, GI4

Descrição UNIPROT	Número de acesso UNIPROT (descrição)	Nº peptídeos identificados	Score Progenesis (únicos)	ANOVA (p)	Extratos*
XUV6;R9XUW4;R9YQY9;R9YUB3;V9P6C8;V9P6E8;V9P6Q7;V9P748;V9P7D2;X2JBS3					
Low molecular weight glutenin subunit OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1	I1XB60;A0A060N0C7;A8CA05;B2BZC4;B2BZD0;B2B ZD1;B2BZD2;B2Y2Q6;B2Y2Q7;B2Y2R3;B2Y2R4;B2Y 2R5;B2Y2R6;B2Y2R8;B2Y2S0;B2Y2S1;B2Y2S2;B2Y2 S6;C3VN79;C3VN80;C5IXL3;C8KIL6;D3U318;D3U319 ;D3U326;D3U328;D3UAL6;D3UAL7;D6RVY4;D6RVY7; F8SGL2;F8SGL3;F8SGL4;F8SGL5;F8SGL6;F8SGL7;F 8SGL8;F8SGL9;F8SGM4;F8SGM5;F8SGM7;F8SGM8; F8SGM9;F8SGN3;F8SGN4;F8SGN5;F8SGN6;F8SGN 9;F8SGQ3;I1XB41;I1XB51;Q00M55;Q00M56;Q0GNF9 ;Q0GNG1;Q0QBR3;Q0ZCA8;Q0ZCB0;Q3LGB3;Q4155 1;Q41552;Q571Q5;Q5MFN4;Q5MFQ0;Q5TLY8;Q5TLY 9;Q6J160;Q6J161;Q75ZV9;Q8GU18;Q8H737;Q8W3W 3;Q8W3W4;Q8W3W5;Q8W3W6;Q8W3W8;Q8W3W9; Q8W3X0;Q8W3X2;Q8W3X3;Q8W3X4;Q8W3X6;Q9ZN Y0;R4JAN5;R4JAN9;R4JAQ0;R4JB48;R4JB52;R4JB5 3;R4JB56;R4JB62;R4JBF1;R4JBF5;R4JBG2;R4JBK0; R4JBK6;R4JDK6;R4JDM1;R4JDM5;R4JDN1;R4JFA4;	7 (2)	77,4845	2,70E-07	AG1, GS1, Gl1, GI1 AG4, GS4, Gl4, Gl4

Descrição UNIPROT	Número de acesso UNIPROT (descrição)	Nº peptídeos identificados	Score Progenesis (únicos)	ANOVA (p)	Extratos*
	R4JFP9;R4JFQ3;R9XT50;R9XVA5;R9XVC9;R9XWG9; U6BEQ9;U6BIP1;V6BPA5;V9P737;V9P785				
LMW glutenin OS=Triticuma estivum GN=Glu PE=4 SV=1	K0I5W1;B2Y2S3;K0HZJ2	6 (1)	71,347	1,57E-06	AG1, GS1, Gli1, GI1 AG4, GS4, Gli4, GI4
Low- molecular- weight glutenin subunit OS=Triticum aestivum GN=LMW-GS PE=4 SV=1	R4JBH8;B3EY91;B8R6A0;C3VN74;C3VN75;C3VN76; C3VN77;D2DII1;D2DII3;D2DII7;D3U317;D3UAL5;F8S GQ4;K7RDA5;M1GL80;M1GMA2;M1GP58;P10385;P9 3794;Q0PW11;Q19MN2;Q19MN3;Q19N55;Q5MFG8;Q 5MFH0;Q5MFH2;Q5MFH3;Q6QGW0;Q6SPY7;Q6SPY 8;Q6SPZ0;Q6SPZ1;Q6SPZ2;Q6SPZ3;Q8W3U9;Q8W3 V0;Q8W3V1;R4JAQ1;R4JAR7;R4JB19;R4JB27;R4JB3 4;R4JB50;R4JBE8;R4JBI2;R4JBJ8;R4JD42;R4JF25;R 4JFL5;R4V1P5;R9XT25;R9XT45;R9XUD0;R9XUF2;R9 XUF6;R9XUU0;R9XV91;R9XV98;R9XVB6;R9XWD5;R 9XWE0;R9XWF9;X2J8E3;X2JAE7	4 (2)	19,4698 78	0,0001875 AG1, GS1, Gli1, GI1 AG4, GS4, Gli4, GI4	

* Extratos onde as proteínas foram quantificadas, em negrito o extrato que apresentou maior abundância.

4 CONCLUSÃO

Os métodos multiplexos de análises utilizados nesse estudo provaram que a aplicação da mobilidade iônica nos métodos proteômicos por Espectrometria de Massas favorece a separação de peptídeos devido à melhor especificidade e seletividade da análise. Contudo a aplicação do método de aquisição UDMS^E foi capaz de potencializar ainda mais a identificação de proteínas e peptídeos quando comparado ao método HDMS^E. Isso está diretamente relacionado com a eficácia na eliminação de íons monoprotonados indesejados e com o aumento da fragmentação favorecida pela energia de colisão quase-específica a cada peptídeo aplicada na fragmentação. Embora não tenha sido possível diferenciar as subunidades proteicas entre as variedades estudadas, esse estudo fornece novas perspectivas de avaliação da qualidade tecnológica de farinha de trigo, contribuindo com a pesquisa científica e desenvolvimento de inovações dentro da cadeia produtiva do cereal no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à OR Sementes pelo fornecimento das amostras. Este trabalho foi financiado pela UNIRIO, pelo Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (427116/2018-0), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (26/010.100988/2018; 26/202/709-2018) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código 001)

PARTE III

DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES

FINAIS

CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO

CAPÍTULO 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPÍTULO 6- DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 PRINCIPAIS DESAFIOS ENCONTRADOS

O objetivo central deste trabalho foi caracterizar a fração proteica de farinhas de trigo para revelar os diferentes perfis proteicos de amostras com aptidões tecnológicas contrastantes, aplicando proteômica comparativa não dirigida com abordagens DIA.

Realizar um estudo com abordagem proteômica tendo como alvo as proteínas do trigo apresenta inúmeros desafios que são decorrentes das diferentes etapas necessárias, tais como extração, digestão, identificação e quantificação das proteínas. Iniciando pela etapa de extração, na segunda parte deste manuscrito, foram apresentados dois trabalhos nos quais a extração foi realizada considerando a solubilidade das proteínas segundo a classificação de Osborne (1907). No capítulo 3, o alvo do trabalho foi a caracterização das proteínas de reserva, por isso, foi realizada a etapa de depleção das proteínas metabólicas. Foi possível observar a dificuldade de obtenção de um fracionamento efetivo das frações proteicas pois, mesmo após depleção, muitas proteínas metabólicas foram identificadas na análise proteômica.

No capítulo 5, as proteínas foram fracionadas nas principais classes com obtenção 4 extratos: albuminas/globulinas, gliadinas, gluteninas solúveis e gluteninas insolúveis. Novamente verificou-se a dificuldade de fracionamento, já que proteínas de reserva foram identificadas em todos os extratos, no entanto, como esperado, com maior abundância nos extratos de gluteninas insolúveis. A presença de proteínas metabólicas nos extratos de proteínas de reserva e vice-versa, pode ser explicada pelas diferentes interações proteicas existentes (FERREIRA *et al.*, 2014; GENEIX *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2021; LESAGE *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2021). A interação proteica, principalmente por meio de ligações cruzadas do tipo covalente como as pontes dissulfeto, modifica a solubilidade destas proteínas, fazendo com que monômeros (contendo apenas pontes dissulfeto intramoleculares) das proteínas de reserva sejam solúveis e estejam presentes na fração das proteínas metabólicas. Do mesmo modo, a interação das proteínas metabólicas com as proteínas de reserva por

meio de ligações dissulfeto intermoleculares explica a presença destas proteínas mesmo após a etapa de lavagem ou depleção

No capítulo 4, foi realizada uma extração total de proteínas com utilização de uma solução tampão que fosse apropriada para ambas as frações, prolaminas (proteínas de reserva) e não-prolaminas (metabólicas). Para isso, foi utilizado o tampão Tris-HCl com detergente (SDS), agente alquilante (IAM) e agente redutor (DTT). Como esperado, foi possível identificar proteínas de todas as frações em uma única etapa de extração, sem impacto no número de proteínas identificadas.

Seguindo com a etapa de digestão e, objetivando superar a dificuldade em conseguir peptídeos de tamanho adequado para análise proteômica a partir das proteínas do trigo, em especial das proteínas de reserva, que possuem muito resíduos de prolina e glutamina e poucos de lisina e arginina, gerando clivagens perdidas que dificultam a identificação (VENSEL *et al.*, 2011), foi testada a utilização de duas enzimas proteolíticas: tripsina e tripsina/Lys-C. A tripsina é específica para clivagem C-terminal de resíduos de lisina e arginina e a tripsina/Lys-C melhora a eficiência proteolítica nos sítios de lisina. Assim, conforme esperado, com o uso da tripsina/Lys-C obteve-se um menor percentual de clivagens perdidas (Fig. 1), confirmando a maior eficiência proteolítica em relação à tripsina. Alguns estudos apontam que a utilização de quimotripsina pode gerar maior identificação de peptídeos quando comparado ao uso de tripsina (FIEDLER *et al.*, 2014; VENSEL *et al.*, 2011), mas o uso de tripsina/Lys-C gerou maior número de proteínas identificadas quando comparada aos extratos provenientes da digestão com quimotripsina e Glu-C (VINCENT *et al.*, 2022). Apesar de ser mais específica do que a quimotripsina, a tripsina/Lys-C continua sendo o padrão ouro em análises proteômicas e, por apresentar menor custo, é ideal para análises em larga escala.

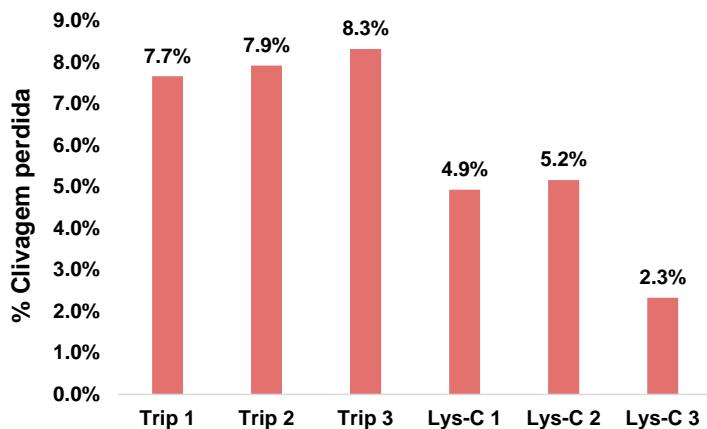


Fig. 1. Percentual de clivagem perdida comparando extratos digeridos com tripsina (Trip) e tripsina/Lys-C (Lys-C) em triplicata.

Diferentes métodos de aquisição independente de dados foram selecionados e aplicados para superar os desafios inerentes da análise proteômica do trigo. O método que apresentou os melhores resultados foi o UDMS^E que apresentou maior identificação de peptídeos e proteínas (60%) com intervalo de confiança de 95%. Tal resultado foi atribuído à significativa melhora na fragmentação dos íons precursores quando comparado ao método HDMS^E. Limitações de acesso aos recursos técnicos necessários não permitiram a utilização do método UDMS^E em todos os experimentos deste trabalho, no entanto os demais métodos que utilizam abordagem independentes de dados, MS^E (capítulo 3) e HDMS^E (capítulo 4), este último com sistema de mobilidade iônica, mostraram-se bastante efetivos para identificação das proteínas do trigo, comprovado pela faixa dinâmica com mais de 6 ordens de magnitude ($\log_{10} > 6$) (Fig. 2). Pelo método HDMS^E foi obtido maior número de identificação em cada amostra (a partir de extratos totais de proteínas) quando comparado com o método MS^E (a partir de extratos de proteínas de reserva).

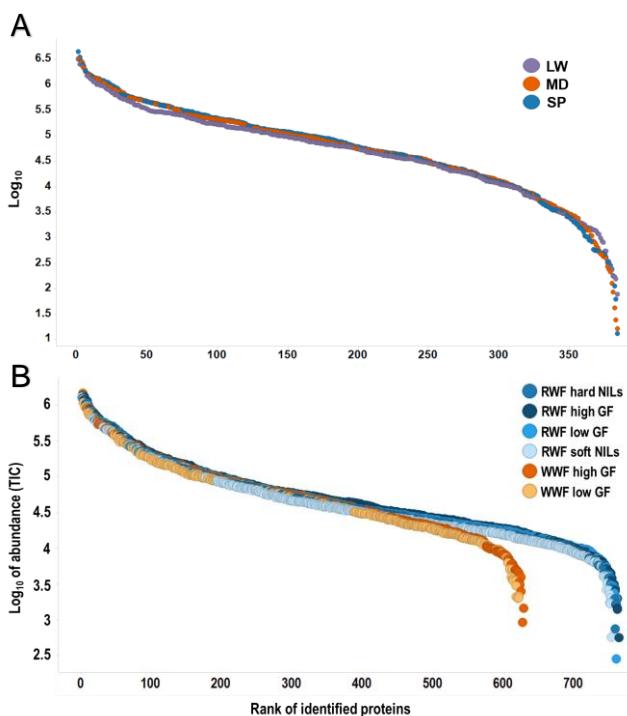


Fig. 2. Faixas dinâmicas obtidas com os métodos (A) MS^{E} , para proteínas de reserva e (B) HDMS^{E} , para proteínas totais.

6.2 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PORTEICO DAS AMOSTRAS DE DIFERENTES APTIDÕES TECNOLÓGICAS

A comparação dos resultados obtidos em cada análise proteômica com o banco de dados gerou uma lista de proteínas identificadas nas amostras. A principal estratégia utilizada foi a determinação e avaliação de proteínas que se apresentavam diferencialmente abundantes (DAP) nas amostras². Para isso, as comparações foram feitas em pares com a premissa de que a proteína deveria coexistir nas duas amostras e ter sido quantificada nas três replicatas de cada amostra. De modo a garantir a confiabilidade dos resultados, foram aplicados critérios rigorosos considerando a quantidade mínima de peptídeos exclusivos e de outros peptídeos para identificação e pontos de corte como: $p < 0,05$, Log₂ da abundância $\pm 0,6$ e CV < 30%.

No entanto, uma grande parte das proteínas, em torno de 65% das DAP (capítulo 3), não possuíam anotação funcional no banco de dados. Realizamos então, uma predição de domínios, onde os códigos FASTA destas proteínas foram verificados em

² Consideraremos diferencialmente abundantes e diferencialmente acumuladas com o mesmo significado: proteínas que após aplicação de critérios rigorosos apresentaram-se superexpressas ou subexpressas nas amostras.

três bancos de dados de família de proteínas (InterPro, Pfam e Prosite) em busca dos domínios relacionados. Com isso, conseguimos obter um melhor entendimento da provável função das proteínas. Essa estratégia teve grande impacto nos resultados, principalmente visualizado na análise de mapa de calor, onde as amostras de alta e média força do glúten foram agrupadas, enquanto que no mapa de calor feito apenas com os 35% das DAP que já estavam anotadas, as amostras de média e baixa força do glúten foram agrupadas.

No capítulo 4, a categorização por ontologia genética foi realizada para caracterizar as proteínas identificadas e quantificadas. Nesta etapa, as proteínas foram classificadas quanto à sua função molecular, processo biológico envolvido e o componente celular de localização. As informações obtidas também foram utilizadas para melhor compreensão dos processos biológicos nos quais DAP e proteínas exclusivas estavam envolvidas. A partir dos dados obtidos, foi possível caracterizar os diferentes perfis proteicos das amostras com diferentes aptidões tecnológicas. Uma síntese dos resultados obtidos pelas abordagens proteômicas utilizadas neste trabalho, bem como um índice de representações ilustrativas onde foram evidenciadas diferenças no perfil proteico das amostras está apresentado na Tabela 1.

Tabela: 1. Resumo das abordagens proteômicas utilizadas para caracterizar proteínas do trigo.

Informação	Artigo 1 (cap.3)	Artigo 2 (cap.4)	Artigo 3 (cap.5)
Alvo do estudo	subproteoma	proteoma	proteoma
Fração proteica	Proteínas de reserva	Proteínas metabólicas e de reserva	Proteínas metabólicas e de reserva
Tipo de extração	sequencial	total	sequencial
Técnica utilizada	NanoUPLC-MS ^E	NanoUPLC-HDMS ^E	NanoUPLC-HDMS ^E e UDMSE
Objetivo	Comparar amostras agrupadas pela aptidão tecnológica	Comparar amostras de diferentes aptidões	Comparar métodos de análise
Diferentes perfis de abundância diferencial	Fig. 3; Tabela 2	Fig. 3; Tabela 1; material suplementar S8-S10	-
Lista de proteínas exclusivas	-	Tabela 1	-
Diferentes domínios	Fig. 4; Material suplementar S3	-	-
Classificação biológica das proteínas diferenciais	-	Fig.4	-
Análise quimiométrica	Fig. 2	Fig.5	-

6.3 PRINCIPAIS RESULTADOS

Na tabela 2 estão apresentados os objetivos com os principais resultados alcançados nesta tese.

Tabela: 2. Principais resultados ligados aos objetivos alcançados.

OBJETIVO	PRINCIPAIS RESULTADOS	VALORIZAÇÃO
I. Revelar os diferentes perfis proteicos de amostras de farinha de trigo comum evidenciando as proteínas que contribuem para a aptidão tecnológica e uso final da farinha	LMW-GS, γ -gliadinas e α -gliadinas encontradas superexpressas nas amostras de alta força do glúten; Puroindolininas e GSP encontradas superexpressas nas amostras de baixa força do glúten; LMW-GS, HMW-GS e <i>small</i> HSPs: possíveis marcadores específicos das farinhas de alta força do glúten e de fenótipo <i>hard</i> ; PINA, PINB2 e GSP: possíveis marcadores das farinhas de baixa força do glúten;	Artigos mencionados abaixo.
II. Identificar e quantificar proteínas do glúten em amostras agrupadas por diferentes aptidões tecnológicas distinguindo os perfis proteicos	1.297 proteínas identificadas e quantificadas somando todas as amostras; Faixa dinâmica superior a 6 ordens de magnitude; 116 proteínas diferencialmente abundantes (DAP); PCA agrupou amostras de alta força do glúten separadas das de baixa força do glúten; Mapa de calor das DAP separou a amostra de alta força do glúten das de média e baixa; Mapa de calor após predição de domínios agrupou amostras de maior força do glúten; A caracterização de proteínas do glúten em amostras agrupadas por diferentes aptidões tecnológicas revelou possíveis marcadores proteicos.	1 artigo original publicado, 1 pôster

OBJETIVO	PRINCIPAIS RESULTADOS	VALORIZAÇÃO
III. Revelar e avaliar o perfil proteico de amostras de farinha de trigo com força do glúten contrastantes (farinhas integrais e refinadas) e de farinhas refinadas de linhagens quase-isogênicas com fenótipos diferentes	<p>Total de 973 proteínas identificadas e quantificadas;</p> <p>Faixa dinâmica > 6 ordens de magnitude;</p> <p>247 DAP com filtro e 273 sem filtro de CV.</p> <p>Amostras de alta força do glúten e fenótipo (<i>farinhas integrais e hard</i>) apresentaram maior número de proteínas, de DAP e maior diversidade de processos biológicos quando comparados com seus pares de baixa força do glúten e fenótipo <i>soft</i>;</p> <p>Análise quimiométrica agrupou amostras de alta força do glúten e com textura <i>hard</i>;</p> <p>A caracterização do perfil proteico das amostras revelou possíveis marcadores proteicos relacionados à aptidão tecnológica.</p>	1 artigo original em preparação para ser submetido
IV. Apresentar e comparar métodos de aquisição de alta definição em NanoUPLC-MS/MS que permitem caracterização das proteínas do trigo	<p>Superioridade do método UDMS^E em comparação ao HDMS^E;</p> <p>Total de 1.800 proteínas identificadas com os dois métodos;</p> <p>UDMS^E melhorou em 60% a identificação de peptídeos e proteínas (intervalo de confiança de 95%);</p> <p>UDMS^E melhorou a fragmentação dos precursores, principalmente em íons com <i>m/z</i> superior a 1.200;</p> <p>UDMS^E potencializou a identificação pela eliminação de íons monoprotonados e pela melhor fragmentação com energia de colisão quasi-específica à relação <i>m/z</i> de cada peptídeo.</p>	1 capítulo publicado em coletânea nacional

CAPÍTULO 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trigo é uma importante fonte de carboidratos e de proteínas na alimentação humana. Além disso, o teor de fibras, vitaminas, minerais e compostos fenólicos também dever ser considerado, uma vez que este cereal apresenta amplo consumo mundial. A versatilidade de uso do trigo em diversos produtos como biscoitos, bolos, massas, pães e outros produtos de confeitoraria consolidam esse cenário e a aptidão tecnológica do grão é justamente o fator que define o uso final do trigo.

Sabe-se que a aptidão tecnológica é influenciada pelas proteínas presentes no grão e grande esforço tem sido realizado ao longo de décadas no intuito de caracterizar as proteínas e compreender a participação delas nas características tecnológicas. A maior parte dos estudos reportados na literatura, principalmente envolvendo a caracterização do trigo brasileiro, basearam-se em análises físico-químicas e reológicas, bem como na determinação da relação do teor proteico total, da razão entre as frações proteicas (metabólicas e de reserva e entre suas subunidades) e na forma com que as proteínas se agregam em polímeros.

Neste sentido, o estudo da determinação do perfil proteico relacionado à aptidão tecnológica do trigo é fundamental e desperta o interesse na aplicação de técnicas altamente eficientes baseadas em métodos otimizados como os que são utilizados em análises proteômicas atualmente. Diante do exposto, neste trabalho aplicou-se a cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas de alta definição usando métodos MS^E para caracterizar de forma abrangente o perfil proteico de amostras de farinha de trigo comum com diferentes aptidões tecnológicas.

Foi possível diferenciar o perfil proteico das amostras com a análise de abundância diferencial, bem como com dados de categorização biológica de proteínas disponíveis em bancos de dados. Verificou-se diferença no perfil proteico tanto para a fração de proteínas metabólicas quanto das proteínas de reserva entre as diferentes amostras classificadas previamente pelas características reológicas. As amostras de alta força do glúten apresentaram um maior número de DAP, diferentes domínios funcionais e maior diversidade de processos biológicos do que as amostras com baixa força do glúten. Os achados confirmaram a primeira hipótese que norteou o trabalho

de que existem diferenças no perfil proteico que explicam as diferentes aptidões tecnológicas das amostras.

A hipótese de que a caracterização do perfil proteico de farinhas de trigo pela utilização de abordagem proteômica pode revelar possíveis marcadores proteicos relacionados à aptidão tecnológica do trigo também foi confirmada, pois algumas DAP encontradas nas amostras foram indicadas como possíveis marcadores específicos para determinada aptidão tecnológica, com LMW-GS, HMW-GS e *small* HSPs apontadas como possíveis marcadores das farinhas de alta força do glúten e de fenótipo hard, bem como PINA, PINB2 e GSP como possíveis marcadores das farinhas de baixa força do glúten. Esses resultados contribuem tanto para os avanços na área da química de cereais quanto no campo da melhoria do trigo.

As análises quimiométricas foram fundamentais para análise e distinção de amostras de diferentes aptidões tecnológicas corroborando os resultados encontrados nas demais estratégias utilizadas. Foi possível concluir que os perfis proteicos diferentes permitiram a distinção entre as amostras de alta força do glúten daquelas de baixa força do glúten.

Este trabalho destacou métodos altamente eficientes que permitiram a identificação e quantificação de proteínas do trigo, com especial atenção para o método UDMS^E que mostrou superioridade em termos de fragmentação e identificação de peptídeos e proteínas quando comparado com o método HDMS^E. Juntos, os resultados apontaram que a abordagem utilizada foi capaz de gerar resultados valiosos e abrangentes que permitiram avançar na compreensão do perfil proteico atrelado à aptidão tecnológica.

Pela temática abordada e utilização de técnicas excelentes para alcançar os objetivos, conclui-se que esse trabalho é de grande relevância em termos de estudos na cadeia produtiva do trigo e tem sua importância justificada.

Como perspectivas, buscando aprofundar o conhecimento sobre as proteínas com impacto na aptidão tecnológica, principalmente no trigo brasileiro, o estudo de cultivares provenientes de outras áreas tríticas do país buscando confirmar a presença das proteínas apontadas como possíveis biomarcadores de qualidade torna-se interessante. No que tange às proteínas de reserva, o estudo da formação dos polímeros ao longo do desenvolvimento do grão nas amostras de aptidões tecnológicas contrastantes também é promissor.

REFERÊNCIAS

- AACC. Approved methods. In. 10th ed. Minneapolis, MN: American Association of Cereal Chemists, 2000.
- ABITRIGO. **Associação Brasileira das Indústrias de Trigo**. Brasil, 2022. Disponível em: <http://www.abitriago.com.br/estatisticas-abitriago/trigo-e-a-farinha-no-mundo/>. Acesso em: 26 de março de 2022.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, 537, n. 7620, p. 347-355, 2016.
- AFZAL, M.; PFANNSTIEL, J.; ZIMMERMANN, J.; BISCHOFF, S. C. et al. High-resolution proteomics reveals differences in the proteome of spelt and bread wheat flour representing targets for research on wheat sensitivities. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 1-11, 2020.
- AFZAL, M.; SIELAFF, M.; CURELLA, V.; NEERUKONDA, M. et al. Characterization of 150 Wheat Cultivars by LC-MS-Based Label-Free Quantitative Proteomics Unravels Possibilities to Design Wheat Better for Baking Quality and Human Health. **Plants**, 10, n. 3, p. 424, 2021.
- AGHAGHOLIZADEH, R.; KADIVAR, M.; NAZARI, M.; MOUSAVI, F. et al. Characterization of wheat gluten subunits by liquid chromatography–Mass spectrometry and their relationship to technological quality of wheat. **Journal of Cereal Science**, 76, p. 229-235, 2017.
- ALTENBACH, S. B.; TANAKA, C. K.; WHITEHAND, L. C.; VENSEL, W. H. Effects of post-anthesis fertilizer on the protein composition of the gluten polymer in a US bread wheat. **Journal of Cereal Science**, 68, p. 66-73, 2016.
- ALVES, T. O.; D'ALMEIDA, C. T. S.; FERREIRA, M. S. L. Determination of Gluten Peptides Associated with Celiac Disease by Mass Spectrometry. In: **Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity**: InTech, 2017.
- ALVES, T. O.; D'ALMEIDA, C. T. S.; SCHERF, K. A.; FERREIRA, M. S. L. Modern approaches in the identification and quantification of immunogenic peptides in cereals by LC-MS/MS. **Frontiers in Plant Science**, 10, 2019.
- ALVES, T. O.; D'ALMEIDA, C. T. S.; VICTORIO, V. C. M.; SOUZA, G. H. M. F. et al. Immunogenic and allergenic profile of wheat flours from different technological qualities revealed by ion mobility mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, 73, p. 67-75, 2018/10/01/ 2018.
- ARENA, S.; D'AMBROSIO, C.; VITALE, M.; MAZZEO, F. et al. Differential representation of albumins and globulins during grain development in durum wheat and its possible functional consequences. **Journal of Proteomics**, 162, p. 86-98, 6/6/ 2017.
- BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. **LWT - Food Science and Technology**, 51, n. 1, p. 211-217, 4// 2013.
- BÉKÉS, F. New aspects in quality related wheat research: 1. Challenges and achievements. **Cereal Research Communications**, 40, n. 2, p. 159-184, 2012.

- BEOM, H.-R.; KIM, J. S.; JANG, Y.-R.; LIM, S.-H. *et al.* Proteomic analysis of low-molecular-weight glutenin subunits and relationship with their genes in a common wheat variety. **3 Biotech**, 8, n. 1, p. 56, 2018.
- BORÉM, A.; SCHEEREN, P. L. **Trigo: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015. 260p., 2015. (Embrapa Trigo-Livro técnico (INFOTECA-E). 8572695222.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Instrução normativa nº 8, 03 jun. 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de Trigo. MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, P. e. A. : Diário Oficial da República Federativa do Brasil 2005.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 38 de 30 de novembro de 2010. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. e. A. : Diário Oficial da União 2010.
- BROMILOW, S.; GETHINGS, L. A.; BUCKLEY, M.; BROMLEY, M. *et al.* A curated gluten protein sequence database to support development of proteomics methods for determination of gluten in gluten-free foods. **Journal of Proteomics**, 163, n. Supplement C, p. 67-75, 2017/06/23/ 2017a.
- BROMILOW, S. N. L.; GETHINGS, L. A.; LANGRIDGE, J. I.; SHEWRY, P. R. *et al.* Comprehensive Proteomic Profiling of Wheat Gluten Using a Combination of Data-Independent and Data-Dependent Acquisition. **Frontiers in Plant Science**, 7, p. 2020, 2017b.
- BURRIEZA, H. P.; RIZZO, A. J.; VALE, E. M.; SILVEIRA, V. *et al.* Shotgun proteomic analysis of quinoa seeds reveals novel lysine-rich seed storage globulins. **Food chemistry**, 293, p. 299-306, 2019.
- CHAPMAN, J. D.; GOODLETT, D. R.; MASSELON, C. D. Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling. **Mass spectrometry reviews**, 33, n. 6, p. 452-470, 2014.
- CLAVIJO, B. J.; VENTURINI, L.; SCHUDOMA, C.; ACCINELLI, G. G. *et al.* An improved assembly and annotation of the allohexaploid wheat genome identifies complete families of agronomic genes and provides genomic evidence for chromosomal translocations. **Genome research**, 27, n. 5, p. 885-896, 2017.
- COLGRAVE, M. L.; GOSWAMI, H.; BYRNE, K.; BLUNDELL, M. *et al.* Proteomic profiling of 16 cereal grains and the application of targeted proteomics to detect wheat contamination. **Journal of Proteome Research**, 14, n. 6, p. 2659-2668, 2015. Article.
- CONAB. Acomp. safra bras. grãos. Brasília. v. 7 - Safra 2019/20 - Oitavo levantamento, p. 1-31, maio 2020.
- CONAB. Acomp. safra brasileira de grãos. Brasília. v.9 - Safra 2021/22, n.5 - Quinto levantamento, p. 1-101, fevereiro 2022. 2022a.
- CONAB. Acomp. safra brasileira de grãos. Brasília: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. v. 9, safra 2021/22, n. 4 - Q uarto levantamento, janeiro. 2022. 2022b.

- COSTA, M. d. G. d.; SOUZA, E. L. d.; STAMFORD, T. L. M.; ANDRADE, S. A. C. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. **Food Science and Technology**, 28, n. 1, p. 220-225, 2008.
- COSTA, M. S.; SCHOLZ, M. B. d. S.; FRANCO, C. M. L. Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. **Food Science and Technology (Campinas)**, 33, p. 163-170, 2013.
- COSTA, M. S.; SCHOLZ, M. B. d. S.; MIRANDA, M. Z.; FRANCO, C. M. L. Effect of glutenin subunits on the baking quality of Brazilian wheat genotypes. **Bragantia**, 76, n. 1, p. 11-22, 2017.
- CUNSOLO, V.; MUCCILLI, V.; SALETTI, R.; FOTI, S. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial. **Journal of Mass Spectrometry**, 49, n. 9, p. 768-784, 2014.
- D'OIDIO, R.; MASCI, S. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. **Journal of Cereal Science**, 39, n. 3, p. 321-339, 2004.
- DAHESH, M.; BANC, A.; DURI, A.; MOREL, M.-H. et al. Polymeric Assembly of Gluten Proteins in an Aqueous Ethanol Solvent. **The Journal of Physical Chemistry B**, 118, n. 38, p. 11065-11076, 2014/09/25 2014.
- DE BRIER, N.; GOMAND, S. V.; CELUS, I.; COURTIN, C. M. et al. Extractability and Chromatographic Characterization of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Bran Protein. **Journal of food science**, 80, n. 5, p. C967-C974, 2015.
- DE SANTIS, M. A.; CUNSOLO, V.; GIULIANI, M. M.; DI FRANCESCO, A. et al. Gluten proteome comparison among durum wheat genotypes with different release date. **Journal of Cereal Science**, 96, p. 103092, 2020.
- DEL COUR, J. A.; JOYE, I. J.; PAREYT, B.; WILDERJANS, E. et al. Wheat Gluten Functionality as a Quality Determinant in Cereal-Based Food Products. **Annual Review of Food Science and Technology**, Vol 3, 3, p. 469-492, 2012. Review; Book Chapter.
- DHAKA, V.; KHATKAR, B. S. Effects of Gliadin/Glutenin and HMW-GS/LMW-GS Ratio on Dough Rheological Properties and Bread-Making Potential of Wheat Varieties. **Journal of Food Quality**, 38, n. 2, p. 71-82, 2015.
- DISTLER, U.; KUHAREV, J.; NAVARRO, P.; LEVIN, Y. et al. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. **Nature Methods**, 11, n. 2, p. 167-170, 2014.
- DISTLER, U.; KUHAREV, J.; NAVARRO, P.; TENZER, S. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. **Nat. Protocols**, 11, n. 4, p. 795-812, 04/print 2016. Protocol.
- DONG, K.; GE, P.; MA, C.; WANG, K. et al. Albumin and globulin dynamics during grain development of elite Chinese wheat cultivar Xiaoyan 6. **Journal of Cereal Science**, 56, n. 3, p. 615-622, 11// 2012.
- DOS SANTOS-DONADO, P. R.; DONADO-PESTANA, C. M.; KAWAHARA, R.; ROSA-FERNANDES, L. et al. Comparative analysis of the protein profile from biofortified cultivars of quality protein maize and conventional maize by gel-based and gel-free proteomic approaches. **LWT**, 138, p. 110683, 2021.

- DUPONT, F. M.; VENSEL, W. H.; TANAKA, C. K.; HURKMAN, W. J. *et al.* Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. **Proteome Science**, 9, n. 1, p. 1, 2011.
- FAN, W.; ZHENG, H.; WANG, G. Proteomic analysis of ubiquitinated proteins in maize immature kernels. **Journal of Proteomics**, 243, p. 104261, 2021.
- FAO. Crop Prospects and Food Situation – Quarterly Global Report No. 1. March 2022. Rome 2022.
- FEILLET, P. *In: INRA (Ed.). Le grain de blé. Composition et utilisation.* Paris, 2000.
- FERREIRA, M. S. L.; MANGAVEL, C.; ROGNIAUX, H.; BONICEL, J. *et al.* A MALDI-TOF based study of the in-vivo assembly of glutenin polymers of durum wheat. **Food Research International**, 63, p. 89-99, 2014.
- FIEDLER, K. L.; MCGRATH, S. C.; CALLAHAN, J. H.; ROSS, M. M. Characterization of Grain-Specific Peptide Markers for the Detection of Gluten by Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, n. 25, p. 5835-5844, 2014/06/25 2014.
- FINN, R. D.; ATTWOOD, T. K.; BABBITT, P. C.; BATEMAN, A. *et al.* InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. **Nucleic acids research**, 45, n. D1, p. D190-D199, 2017.
- FINN, R. D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R. *et al.* The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic acids research**, 44, n. D1, p. D279-D285, 2016.
- FINNIE, C.; SULTAN, A.; GRASSER, K. D. From protein catalogues towards targeted proteomics approaches in cereal grains. **Phytochemistry**, 72, n. 10, p. 1145-1153, 2011.
- GAO, L.; WANG, A.; LI, X.; DONG, K. *et al.* Wheat quality related differential expressions of albumins and globulins revealed by two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE). **Journal of proteomics**, 73, n. 2, p. 279-296, 2009.
- GENEIX, N.; DALGALARRONDO, M.; TASSY, C.; NADAUD, I. *et al.* Relationships between puroindoline A-prolamин interactions and wheat grain hardness. **PloS one**, 15, n. 9, p. e0225293, 2020.
- GEROMANOS, S. J.; VISSERS, J. P. C.; SILVA, J. C.; DORSCHL, C. A. *et al.* The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. **Proteomics**, 9, n. 6, p. 1683-1695, 2009.
- GILLET, L. C.; LEITNER, A.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry applied to bottom-up proteomics: entering the high-throughput era for hypothesis testing. **Annual Review of Analytical Chemistry**, 9, p. 449-472, 2016.
- GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M. *et al.* Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, 16, n. 1–3, p. 12-30, 1// 2005.

- GRAZIANO, S.; MARANDO, S.; PRANDI, B.; BOUKID, F. et al. Technological quality and nutritional value of two durum wheat varieties depend on both genetic and environmental factors. **Journal of agricultural and food chemistry**, 67, n. 8, p. 2384-2395, 2019.
- GUO, G.; LV, D.; YAN, X.; SUBBURAJ, S. et al. Proteome characterization of developing grains in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum L.*). **BMC Plant Biol**, 12, p. 147, Aug 19 2012.
- GUO, J.; QU, L.; HU, Y.; LU, W. et al. Proteomics reveals the effects of drought stress on the kernel development and starch formation of waxy maize. **BMC plant biology**, 21, n. 1, p. 1-14, 2021.
- GUTKOSKI, L. C.; DURIGON, A.; MAZZUTTI, S.; SILVA, A. C. T. d. et al. Efeito do período de maturação de grãos nas propriedades físicas e reológicas de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28, n. 4, p. 888-894, 2008.
- HEINZE, K.; KISZONAS, A. M.; MURRAY, J. C.; MORRIS, C. F. et al. Puroindoline genes introduced into durum wheat reduce milling energy and change milling behavior similar to soft common wheats. **Journal of Cereal Science**, 71, p. 183-189, 9// 2016.
- HEMERY, Y.; ROUAU, X.; LULLIEN-PELLERIN, V.; BARRON, C. et al. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. **Journal of Cereal Science**, 46, n. 3, p. 327-347, 2007.
- HILL, K.; HORVÁTH-SZANICS, E.; HAJÓS, G.; KISS, É. Surface and interfacial properties of water-soluble wheat proteins. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 319, n. 1, p. 180-187, 2008.
- HURKMAN, W. J.; VENSEL, W. H.; TANAKA, C. K.; WHITEHAND, L. et al. Effect of high temperature on albumin and globulin accumulation in the endosperm proteome of the developing wheat grain. **Journal of Cereal Science**, 49, n. 1, p. 12-23, 1// 2009.
- IGREJAS, G.; GABORIT, T.; OURY, F.-X.; CHIRON, H. et al. Genetic and environmental effects on puroindoline-a and puroindoline-b content and their relationship to technological properties in French bread wheats. **Journal of Cereal Science**, 34, n. 1, p. 37-47, 2001.
- IWGSC; APPELS, R.; EVERSOLE, K.; STEIN, N. et al. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. **Science**, 361, n. 6403, p. eaar7191, 2018.
- JI, T.; MA, F.; BAIK, B. K. Biochemical characteristics of soft wheat grain associated with endosperm separation from bran and flour yield. **Cereal Chemistry**, 97, n. 3, p. 566-572, 2020.
- JIA, X.-Y.; XU, C.-Y.; JING, R.-L.; LI, R.-Z. et al. Molecular cloning and characterization of wheat calreticulin (CRT) gene involved in drought-stressed responses. **Journal of experimental botany**, 59, n. 4, p. 739-751, 2008.
- JOPPA, L. R.; KHAN, K.; WILLIAMS, N. D. Chromosomal location of genes for gliadin polypeptides in durum wheat *Triticum turgidum L.* **Theoretical and Applied Genetics**, 64, n. 4, p. 289-293, 1983.
- KASARDA, D. D. Glutenin structure in relation to wheat quality. **Wheat is unique**, p. 277-302, 1989.

- KASARDA, D. D.; ADALSTEINS, E.; LEW, E. J. L.; LAZO, G. R. *et al.* Farinin: Characterization of a novel wheat endosperm protein belonging to the prolamin superfamily. **Journal of agricultural and food chemistry**, 61, n. 10, p. 2407-2417, 2013.
- KHAN, S.; JABEEN, R.; DEEBA, F.; WAHEED, U. *et al.* Heat Shock Proteins: Classification, Functions and Expressions in Plants during Environmental Stresses. **Journal of Bioresource Management**, 8, n. 2, p. 9, 2021.
- KHAN, S.; MEMON, A. N.; GHANGHRO, A. B.; NABI, G. Characterization of Wheat protein (Albumin) in different varieties of wheat cultivated in Sindh through SDS-PAGE Electrophoresis. **Sindh University Research Journal-SURJ (Science Series)**, 47, n. 2, 2015.
- KIM, Y. J.; CHOI, S. H.; PARK, B. S.; SONG, J. T. *et al.* Proteomic analysis of the rice seed for quality improvement. **Plant breeding**, 128, n. 6, p. 541-550, 2009.
- KIMURA, S.; HIGASHINO, Y.; KITAO, Y.; MASUDA, T. *et al.* Expression and characterization of protein disulfide isomerase family proteins in bread wheat. **BMC plant biology**, 15, n. 1, p. 1, 2015.
- KÖHLER, P.; BELITZ, H. D.; WIESER, H. Disulfide bonds in wheat gluten - Further cystine peptides from high-molecular-weight (HMW) and low-molecular-weight (LMW) subunits of glutenin and from gamma-gliadins. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung**, 196, n. 3, p. 239-247, Mar 1993.
- KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.-L. *et al.* Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, 870, n. Supplement C, p. 29-44, 2015/04/22/ 2015.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAINO, P.; SHELTON, D.; FINNIE, C.; DE LEONARDIS, A. M. *et al.* Comparative proteome analysis of metabolic proteins from seeds of durum wheat (cv. Svevo) subjected to heat stress. **Proteomics**, 10, n. 12, p. 2359-2368, 2010. Article.
- LANDOLFI, V.; D'AURIA, G.; NICOLAI, M. A.; NITRIDE, C. *et al.* The effect of nitrogen fertilization on the expression of protein in wheat and tritordeum varieties using a proteomic approach. **Food Research International**, 148, p. 110617, 2021.
- LANGENKÄMPER, G.; ZÖRB, C. Modern aspects of wheat grain proteins. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, 92, p. 240-245, 2019.
- LARRE, C.; LUPI, R.; GOMBAUD, G.; BROSSARD, C. *et al.* Assessment of allergenicity of diploid and hexaploid wheat genotypes: identification of allergens in the albumin/globulin fraction. **J Proteomics**, 74, n. 8, p. 1279-1289, Aug 12 2011.
- LESAGE, V. S.; MERLINO, M.; CHAMBON, C.; BOUCHET, B. *et al.* Proteomes of hard and soft near-isogenic wheat lines reveal that kernel hardness is related to the amplification of a stress response during endosperm development. **Journal of experimental botany**, 63, n. 2, p. 1001-1011, 2012.
- LEW, E. J. L.; KUZMICKY, D. D.; KASARDA, D. D. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium

- dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. **Cereal Chemistry**, 69, p. 508-508, 1992.
- LEXHALLER, B.; COLGRAVE, M. L.; SCHERF, K. A. Characterization and relative quantitation of wheat, rye and barley gluten protein types by LC-MS/MS. **Frontiers in Plant Science**, 10, p. 1530, 2019.
- LI, X.; LI, Y.; YU, X.; SUN, F. et al. Genomics-enabled analysis of Puroindoline b2 genes identifies new alleles in wheat and related Triticeae species. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 4, p. 1304, 2020.
- LI, Y.; LIU, K.; CHEN, F.; CHENG, Y. Comparative proteomics analysis reveals the effect of germination and selenium enrichment on the quality of brown rice during storage. **Food chemistry**, 269, p. 220-227, 2018a.
- LI, Z.; LI, Z.; MUHAMMAD, W.; LIN, M. et al. Proteomic analysis of positive influence of alternate wetting and moderate soil drying on the process of rice grain filling. **Plant Growth Regulation**, 84, n. 3, p. 533-548, 2018b.
- LIN, S. K.; CHANG, M. C.; TSAI, Y. G.; LUR, H. S. Proteomic analysis of the expression of proteins related to rice quality during caryopsis development and the effect of high temperature on expression. **Proteomics**, 5, n. 8, p. 2140-2156, 2005.
- LIU, L.; HE, Z.; YAN, J.; ZHANG, Y. et al. Allelic variation at the Glu-1 and Glu-3 loci, presence of the 1B. 1R translocation, and their effects on mixographic properties in Chinese bread wheats. **Euphytica**, 142, n. 3, p. 197-204, 2005.
- LIU, L.; WANG, A.; APPELS, R.; MA, J. et al. A MALDI-TOF based analysis of high molecular weight glutenin subunits for wheat breeding. **Journal of Cereal Science**, 50, n. 2, p. 295-301, 9// 2009.
- LIU, P.; MA, X.; WAN, H.; ZHENG, J. et al. Effects of differential nitrogen application on wheat grain proteome. **Journal of Cereal Science**, 102, p. 103367, 2021.
- LIU, W.; ZHANG, Y.; GAO, X.; WANG, K. et al. Comparative proteome analysis of glutenin synthesis and accumulation in developing grains between superior and poor quality bread wheat cultivars. **J Sci Food Agric**, 92, n. 1, p. 106-115, Jan 15 2012.
- LIU, Y.; PAN, T.; TANG, Y.; ZHUANG, Y. et al. Proteomic analysis of rice subjected to low light stress and overexpression of OsGAPB increases the stress tolerance. **Rice**, 13, n. 1, p. 1-10, 2020.
- ULLIEN-PELLERIN, V. Both genetic and environmental conditions affect wheat grain texture: Consequences for grain fractionation and flour properties. **Journal of Cereal Science**, 92, p. 102917, 2020.
- ULLIEN-PELLERIN, V.; HARASZI, R.; ANDERSSEN, R. S.; MORRIS, C. F. Understanding the mechanics of wheat grain fractionation and the impact of Puroindolines on milling and product quality. In: **Wheat quality for improving processing and human health**: Springer, 2020. p. 369-385.
- ULLIEN-PELLERIN, V.; MARION, D. Plant cysteine-rich antimicrobial proteins that interact with biological membranes. **Membrane interacting peptides and proteins**, F. Heitz Ed., (pp. 125-146): Research Signpost, ISBN: 81-7736-104-X, Kerala, Inde, p. 125-146, 2002.

- LUTZ, E.; WIESER, H.; KOEHLER, P. Identification of Disulfide Bonds in Wheat Gluten Proteins by Means of Mass Spectrometry/Electron Transfer Dissociation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, n. 14, p. 3708-3716, 2012/04/11 2012.
- LV, L.; ZHAO, A.; ZHANG, Y.; LI, H. et al. Proteome and transcriptome analyses of wheat near isogenic lines identifies key proteins and genes of wheat bread quality. **Scientific Reports**, 11, n. 1, p. 1-15, 2021.
- MA, F.; LI, M.; LI, T.; LIU, W. et al. Overexpression of avenin-like b proteins in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) improves dough mixing properties by their incorporation into glutenin polymers. **PloS one**, 8, n. 7, p. e66758, 2013.
- MA, X.; XUE, H.; SUN, J.; SAJJAD, M. et al. Transformation of Pinb-D1x to soft wheat produces hard wheat kernel texture. **Journal of Cereal Science**, 91, p. 102889, 2020.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química nova**, 32, p. 214-222, 2009.
- MARTINEZ-ESTESO, M. J.; NØRGAARD, J.; BROHÉE, M.; HARASZI, R. et al. Defining the wheat gluten peptide fingerprint via a discovery and targeted proteomics approach. **Journal of Proteomics**, 2016.
- MEHRI, N.; FOTOVAT, R.; MIRZAEI, M.; FARD, E. M. et al. Proteomic analysis of wheat contrasting genotypes reveals the interplay between primary metabolic and regulatory pathways in anthers under drought stress. **Journal of Proteomics**, 226, p. 103895, 2020.
- MICHAELEVSKI, I.; KIRSHENBAUM, N.; SHARON, M. T-wave Ion Mobility-mass Spectrometry: Basic Experimental Procedures for Protein Complex Analysis. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 41, p. 1985, 07/31 2010.
- MOGK, A.; RUGER-HERREROS, C.; BUKAU, B. Cellular functions and mechanisms of action of small heat shock proteins. **Annual review of microbiology**, 73, p. 89-110, 2019.
- MOREL, M. H. Acid-polyacrylamide Gel Electrophoresis of Wheat Glutenins: A New Tool for the Separation of High and Low Molecular Weight Subunits. **Cereal Chem**, 71, n. 3, p. 238-242, 1994.
- MORRIS, C. F.; BHAVE, M. Reconciliation of D-genome puroindoline allele designations with current DNA sequence data. **Journal of Cereal Science**, 48, n. 2, p. 277-287, 2008.
- MUCCILLI, V.; CUNSOLO, V.; SALETTI, R.; FOTI, S. et al. Characterisation of a specific class of typical low molecular weight glutenin subunits of durum wheat by a proteomic approach. **Journal of Cereal Science**, 51, n. 1, p. 134-139, 1// 2010.
- NAEEM, H. A.; MACRITCHIE, F. Polymerization of glutenin during grain development in near-isogenic wheat lines differing at Glu-D1 and Glu-B1 in greenhouse and field. **Journal of Cereal Science**, 41, n. 1, p. 7-12, 1 2005.
- NANJO, Y.; SKULTETY, L.; UVÁČKOVÁ, L. u.; KLUBICOVÁ, K. n. et al. Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. **Journal of proteome research**, 11, n. 1, p. 372-385, 2012.

- NEVES, G. W. P.; CURTY, N. d. A.; KUBITSCHEK-BARREIRA, P. H.; FONTAINE, T. et al. Modifications to the composition of the hyphal outer layer of *Aspergillus fumigatus* modulates HUVEC proteins related to inflammatory and stress responses. **Journal of Proteomics**, 151, p. 83-96, 1/16/ 2017.
- OSAWA-MARTÍNEZ, E. E.; MINJAREZ, B.; RODRÍGUEZ-YÁÑEZ, Y.; REZA-ZALDIVAR, E. E. et al. Comparative proteomic analysis of hybrid maize MR2008 and its parental lines. **The Journal of Agricultural Science**, 159, n. 7-8, p. 570-579, 2021.
- OSBORNE, T. B. **The proteins of wheat kernel**. Washington: Carnegie Institute Publication, 84, 1907.
- OSIPOVA, S. V.; PERMYAKOVA, M. D.; PERMYAKOV, A. V. Role of non-prolamин proteins and low molecular weight redox agents in protein folding and polymerization in wheat grains and influence on baking quality parameters. **Journal of agricultural and food chemistry**, 60, n. 49, p. 12065-12073, 2012.
- OURY, F.-X.; LASME, P.; MICHELET, C.; ROUSSET, M. et al. Relationships between wheat grain physical characteristics studied through near-isogenic lines with distinct puroindoline-b allele. **Theoretical and Applied Genetics**, 128, n. 5, p. 913-929, 2015.
- PAULY, A.; PAREYT, B.; FIERENS, E.; DELCOUR, J. A. Wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* L. ssp. *durum*) kernel hardness: I. Current view on the role of puroindolines and polar lipids. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 12, n. 4, p. 413-426, 2013.
- PAYNE, P. I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. **Annual Review of Plant Physiology**, 38, n. 1, p. 141-153, 1987.
- PAYNE, P. I.; CORFIELD, K. G.; HOLT, L. M.; BLACKMAN, J. A. Correlations between the inheritance of certain high-molecular weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 32, n. 1, p. 51-60, 1981.
- PAYNE, P. I.; LAWRENCE, G. J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. **Cereal Research Communications**, p. 29-35, 1983.
- PAYNE, P. I.; NIGHTINGALE, M. A.; KRATTIGER, A. F.; HOLT, L. M. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 40, n. 1, p. 51-65, 1987.
- PELEGRI, L. J.; CARVALHO, I. R.; NARDINO, M.; FERRARI, M. et al. Technological quality of wheat under nitrogen management. **International Journal of Current Research**, 8, n. 06, p. 32932-32936, 2016.
- PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA, G. R. (ed.). **Trigo no Brasil - Bases para produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo- RS -Brasil: Embrapa Trigo, 2011. 488 p.
- PIROZI, M. R.; MARGIOTTA, B.; LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines. **Journal of cereal science**, 48, n. 1, p. 117-122, 2008.

- POPINEAU, Y.; CORNEC, M.; LEFEBVRE, J.; MARCHYLO, B. Influence of high M r glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of glutens and gluten subfractions of near-isogenic lines of wheat Sicco. **Journal of Cereal Science**, 19, n. 3, p. 231-241, 1994a.
- POPINEAU, Y.; POGNA, N.; LEFEBVRE, J. Rheological properties of glutens differing by their glutenin subunit compositions. In: **Wheat kernel proteins-molecular and functional aspects**. Viterbo, Italy: Università Degli Studi della Tuscia, 1994b. p. 129-134.
- PRESUTTI, R. J.; CANGEMI, J. R.; CASSIDY, H. D.; HILL, D. A. Celiac disease. **American family physician**, 76, n. 12, p. 1795-1802, 2007.
- RÍOS-CASTRO, E.; SOUZA, G. H. M. F.; DELGADILLO-ÁLVAREZ, D. M.; RAMÍREZ-REYES, L. et al. Quantitative proteomic analysis of MARC-145 cells infected with a Mexican Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) strain using Label-free based DIA approach. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 2020.
- ROMBOUTS, I.; LAGRIN, B.; BRUNNBAUER, M.; DELCOUR, J. A. et al. Improved identification of wheat gluten proteins through alkylation of cysteine residues and peptide-based mass spectrometry. **Sci. Rep.**, 3, 07/24/online 2013. Article.
- SANTOS, M. C. B.; DA SILVA LIMA, L. R.; DOS SANTOS D'ALMEIDA, C. T.; VICTORIO, V. C. M. et al. Foodomics in wheat flour reveals phenolic profile of different genotypes and technological qualities. **LWT**, 153, p. 112519, 2022.
- SAULNIER, L. Les grains de céréales : diversité et compositions nutritionnelles. **Cahiers de Nutrition et de Diététique**, 47, n. 1, p. S4-S15, 2012/09/01 2012.
- SCHALK, K.; KOEHLER, P.; SCHERF, K. A. Targeted liquid chromatography tandem mass spectrometry to quantitate wheat gluten using well-defined reference proteins. **PLoS one**, 13, n. 2, p. e0192804, 2018.
- SCHERF, K. A.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Gluten and wheat sensitivities—an overview. **Journal of Cereal Science**, 67, p. 2-11, 2015.
- SERNA-SALDIVAR, S. O. **Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 747 p. (Food Preservation Technology).
- SHEWRY, P.; GILBERT, S.; SAVAGE, A.; TATHAM, A. et al. Sequence and properties of HMW subunit 1Bx20 from pasta wheat (*Triticum durum*) which is associated with poor end use properties. **Theoretical and Applied Genetics**, 106, n. 4, p. 744-750, 2003.
- SHEWRY, P. R. Wheat. **Journal of experimental botany**, 60, n. 6, p. 1537-1553, 2009.
- SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, 53, n. 370, p. 947-958, 2002.
- SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **Biochemical journal**, 267, n. 1, p. 1, 1990.
- SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality. **Journal of Cereal Science**, 67, n. Supplement C, p. 12-21, 2016/01/01/ 2016.

- SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S.; FORDE, J.; KREIS, M. et al. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. **Journal of Cereal Science**, 4, n. 2, p. 97-106, 1986.
- SIGRIST, C. J. A.; CERUTTI, L.; DE CASTRO, E.; LANGENDIJK-GENEVAUX, P. S. et al. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. **Nucleic acids research**, 38, n. suppl_1, p. D161-D166, 2010.
- SKYLAS, D. J.; VAN DYK, D.; WRIGLEY, C. W. Proteomics of wheat grain. **Journal of cereal science**, 41, n. 2, p. 165-179, 2005.
- SOUZA, G. H. M. F.; GUEST, P. C.; MARTINS-DE-SOUZA, D. LC-MS E, Multiplex MS/MS, Ion Mobility, and Label-Free Quantitation in Clinical Proteomics. **Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications**, p. 57-73, 2017.
- SURGET, A.; BARRON, C. Histologie du grain de blé. **Industrie des céréales**, n. 145, p. 3-7, 2005.
- TALEUZZAMAN, M.; ALI, S.; GILANI, S. J.; IMAM, S. S. et al. Ultra performance liquid chromatography (UPLC)-a review. **Austin J Anal Pharm Chem**, 2, n. 6, p. 1056, 2015.
- TÁVORA, F. T. P. K.; BEVITORI, R.; MELLO, R. N.; CINTRA, M. M. D. F. et al. Shotgun proteomics coupled to transient-inducible gene silencing reveal rice susceptibility genes as new sources for blast disease resistance. **Journal of Proteomics**, 241, p. 104223, 2021.
- TOMIĆ, J.; TORBICA, A.; POPOVIĆ, L.; STRELEC, I. et al. Albumins Characterization in Relation to Rheological Properties and Enzymatic Activity of Wheat Flour Dough. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 17, n. 4, p. 805-816, 2015.
- VAN DEN BROECK, H. C.; CORDEWENER, J. H. G.; NESSEN, M. A.; AMERICA, A. H. P. et al. Label free targeted detection and quantification of celiac disease immunogenic epitopes by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1391, n. 0, p. 60-71, 4/24/ 2015.
- VENSEL, W. H.; DUPONT, F. M.; SLOANE, S.; ALTENBACH, S. B. Effect of cleavage enzyme, search algorithm and decoy database on mass spectrometric identification of wheat gluten proteins. **Phytochemistry**, 72, n. 10, p. 1154-1161, 2011.
- VENSEL, W. H.; TANAKA, C. K.; ALTENBACH, S. B. Protein composition of wheat gluten polymer fractions determined by quantitative two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. **Proteome science**, 12, n. 1, p. 8, 2014.
- VICTORIO, V. C. M.; ALVES, T. O.; SOUZA, G.; GUTKOSKI, L. C. et al. NanoUPLC-MSE reveals differential abundance of gluten proteins in wheat flours of different technological qualities. **Journal of Proteomics**, 239, p. 104181, 2021.
- VICTORIO, V. C. M.; SOUZA, G. H. M. F.; SANTOS, M. C. B.; VEGA, A. R. et al. Differential expression of albumins and globulins of wheat flours of different technological qualities revealed by nanoUPLC-UDMSE. **Food Chemistry**, 239, p. 1027-1036, 1/15/ 2018.
- VINCENT, D.; BUI, A.; RAM, D.; EZERNIEKS, V. et al. Mining the Wheat Grain Proteome. **International journal of molecular sciences**, 23, n. 2, p. 713, 2022.

- WANG, B.; ZHANG, J.; CHEN, P.; JI, Z. *et al.* Prediction of peptide drift time in ion mobility mass spectrometry from sequence-based features. **BMC bioinformatics**, 14, n. Suppl 8, p. S9, 2013.
- WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, 24, n. 2, p. 115-119, 4// 2007.
- WIŚNIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; NAGARAJ, N.; MANN, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature methods**, 6, n. 5, p. 359-362, 2009.
- WRIGLEY, C. W. Giant proteins with flour power. **Nature**, 381, n. 6585, p. 738-739, 1996.
- XHAFFERAJ, M.; ALVES, T. O.; FERREIRA, M. S. L.; SCHERF, K. A. Recent progress in analytical method development to ensure the safety of gluten-free foods for celiac disease patients. **Journal of Cereal Science**, p. 103114, 2020.
- YU, X.; CHEN, X.; WANG, L.; YANG, Y. *et al.* Novel insights into the effect of nitrogen on storage protein biosynthesis and protein body development in wheat caryopsis. **Journal of experimental botany**, 68, n. 9, p. 2259-2274, 2017.
- ZHANG, L.; DONG, C.; CHEN, Z.; GUI, L. *et al.* WheatGmap: a comprehensive platform for wheat gene mapping and genomic studies. **Molecular Plant**, 14, n. 2, p. 187-190, 2021.
- ZHANG, Y.; HU, X.; JUHASZ, A.; ISLAM, S. *et al.* Characterising avenin-like proteins (ALPs) from albumin/globulin fraction of wheat grains by RP-HPLC, SDS-PAGE, and MS/MS peptides sequencing. **BMC plant biology**, 20, n. 1, p. 1-19, 2020.
- ZHAO, Q.; LIN, J.; YOUSAF, L.; XUE, Y. *et al.* Protein structural properties and proteomic analysis of rice during storage at different temperatures. **Food Chemistry**, 361, p. 130028, 2021.

AOA1D6BR	3	1	19,4046	0,012664	2,101008	MD	WK	Uncharact	3217,713	3379,009	3228,545	3275,089	0,027592	946,2602	2107,673	1712,41	1588,781	0,371665	3162,026	3793,355	3058,745	3338,042	0,119136	
AOA1DSV5	5	2	45,338	0,012682	1,266821	ST	WK	Uncharact	21610,98	21750,09	19528,71	209634,6	0,059365	173058,9	16852	156531,8	156540,9	0,05045	175388,6	204690,5	182083,2	187387,4	0,081938	
AOA1D6B2	2	2	11,2507	0,012927	1,91474	ST	WK	Uncharact	21412,94	23143,99	21252,66	22236,53	0,03096	72413,357	14547,84	13050,82	11613,82	0,332236	22524,8	20692,75	21319,87	22119,14	0,07552	
AOA1DSZD'	4	1	27,8242	0,013018	1,923819	ST	WK	rRNA N-gly	23141,97	23843,41	16238,74	21074,71	0,199421	9820,335	10336,09	12707,44	10954,62	0,140555	9411,545	14482,16	9133,373	11009,03	0,273506	
REVERSE1J	2	1	12,2145	0,014117	1,252857	WK	MD	Reversed S	6748,257	6416,945	6074,538	6413,247	0,052528	7376,764	6302,109	6221,623	6633,499	0,097225	4595,774	5470,439	5385,71	5271,974	0,051911	
P04726	1	1	6,3788	0,014171	2,346034	ST	WK	Alpha/beta	4400,716	2889,758	5007,518	4102,331	0,264626	7451,418	9643,719	11777,48	9624,204	0,224756	6985,578	4894,214	4676,265	5518,686	0,231039	
REVERSE9	1	1	5,2286	0,014531	2,615125	ST	WK	Uncharact	1009,836	903,689	782,3018	928,6065	0,172546	320,2299	194,7382	550,304	355,0907	0,507837	826,2335	867,7822	716,7882	803,6013	0,097063	
AOA1DSW5	1	1	5,5607	0,01543	12,66229	WK	ST	Uncharact	116,8901	302,4987	129,6916	183,0268	0,566384	501,6759	3023,64	3427,301	2317,532	0,684123	319,9327	184,1059	320,9408	274,9931	0,286234	
REVERSE5	1	1	6,4646	0,015934	1,194853	MD	ST	Reversed S	36564,23	39970,36	36800,59	37778,39	0,050346	41854,38	46063,96	42683,25	43533,86	0,051224	46194,96	42005,87	47218,08	45139,64	0,061182	
AOA1D6BR	5	2	41,6561	0,016123	2,333436	ST	WK	Glyceralde	10590,95	103774,9	97732,4	102472,9	0,04138	38335,57	27119,15	66290,33	43915,02	0,459361	57123,11	68391,39	61285,67	62266,72	0,091507	
WS88AT	1	1	5,6025	0,016636	7,824021	MD	WK	Uncharact	9029,842	11702	837,693	703,839	0,181447	2673,52	303,7343	2813,852	1903,360	0,730665	16287,52	11067,4	17954,82	15103,25	0,237908	
REVERSE8	2	1	12,271	0,016892	3,364963	ST	WK	Reversed S	163689	144405	152363,8	153486,3	0,06313	2085,329	32457,71	83456,19	45613,06	0,287883	62171,57	54806,92	64328,9	61135,8	0,086954	
AOA0ACB4E	1	1	6,6482	0,016977	1,222052	MD	WK	405 riboso	19918,2	21204,6	19054,58	20057,36	0,053961	17442,7	16920,69	16015,14	16928,73	0,040319	19180,87	22596,87	19787,42	20127,7	0,08881	
AOA1D6D3	1	1	11,2644	0,017482	8,932544	MD	WK	Uncharact	5687,353	10224,2	80567,49	7899,449	0,280424	15178,6	24562,7	26195,7	26197,6	0,172883	4743,398	7696,131	75583,79	75569,69	0,162129	
REVERSE2	3	3	15,1911	0,01756	1,30899	MD	WK	Reversed S	116852,6	123191,2	147121,1	12844,6	0,127162	133835,6	120915,7	120908,1	12521,9	0,059857	16283,6	153080,4	175821,2	163911,5	0,096604	
AOA1DSVP	3	1	23,6781	0,018047	1,31363	ST	MD	Uncharact	13753,93	12329,8	118855,8	126560,9	0,071705	87281,62	12555,2	102261,5	100699,4	0,126207	9532,28	97873,82	9767,08	96344,39	0,02531	
REVERSE6	1	1	5,137	0,018116	2,458953	ST	WK	Reversed S	837,603	11145,82	11165,39	10229,37	0,156834	2740,833	3148,102	3084,73	3098,23	0,130736	32066,69	14711,52	37354,97	2787,937	0,09776	
P06659	5	4	68,2729	0,019218	1,883817	ST	MD	Gamma-gli	37197,5	37519,7	40652,59	384541	0,04968	21189,02	210219,9	351409,5	25789,3	0,314296	22400,5	17659,1	22695,94	20917,7	0,135169	
AOA1D6C5	5	3	32,3156	0,020368	1,76232	ST	WK	Uncharact	18768,93	18936,83	191575,8	18953,04	0,051803	75896,85	102918,1	143844,3	12140,1	0,020282	12778,1	125479,7	12958,79	127744,8	0,051959	
REVERSE1	4	3	25,9261	0,020404	2,036716	ST	WK	Reversed S	36867,14	38014,64	35454,17	36778,65	0,030507	122859,2	14998,13	268957,1	18078,5	0,340423	212984,2	24141,2	212219,2	25209,2	0,064948	
W5EII9	2	2	8,9772	0,021441	1,264671	ST	WK	Uncharact	92819,39	93807,48	90316,63	93141,05	0,04944	81099,7	74155,87	63729,63	72948,6	0,119772	69733,81	80219,5	72775,82	74243,05	0,072662	
W5H3A0	1	1	13,478	0,022089	3,380897	ST	MD	Uncharact	71781,17	74959,2	92759,2	79332,5	0,141627	161605,5	161562,1	162044,6	152960,5	0,126207	71865,31	65143,57	58992,9	65333,92	0,098545	
P04729;Q8	5	2	65,319	0,022449	1,356574	ST	MD	Gamma-gli	37199,7	37789,45	84820,68	88630,31	0,046949	61130,78	71867,49	75378,42	71559,05	0,137266	14711,52	37354,97	27804,89	20276,4	0,022424	
P81496;Q4	1	1	6,2592	0,022511	2,481052	WK	ST	Allergen	11727,8	13528,41	12026,3	12487,6	0,07463	26616,96	34196,71	31710,85	30982,31	0,130736	32066,69	14711,52	37354,97	27804,89	20276,4	0,022424
AOA1D6CV	1	1	5,5897	0,023191	1,670319	MD	ST	Uncharact	14184,29	13937,3	19673,34	15931,65	0,020354	15065,45	21536,53	20806,1	15656,8	0,099512	27399,83	26079,85	26133,5	26610,4	0,026182	
AOA1D6CR	5	3	50,4353	0,023559	1,434237	MD	ST	Uncharact	91689,3	90283,89	84611,39	88661,45	0,042166	10693,49	12976,89	12140,51	12086,31	0,020282	12410,1	12109,5	12207,6	12270,5	0,021932	
REVERSE6	1	1	13,4526	0,024097	1,660591	ST	MD	Reversed S	114542,5	109081,8	10817,14	110598,6	0,031155	48402,6	48678,70	77899,69	71057,69	0,028295	66254,86	66006,79	67544,8	66601,4	0,021393	
AOA1D6AC	2	2	11,6789	0,024161	1,384893	MD	WK	Uncharact	27293,7	26020,23	23861,29	25725,1	0,06745	19071,88	25667,89	25350,3	23633,36	0,15922	30437,79	34175,96	32775,23	32462,99	0,058175	
AOA1D5DWI	7	1	63,5199	0,024893	5,705794	WK	MD	Fructose-b	1555,83	1764,445	1988,26	1769,52	0,072229	18263,47	3406,37	21674,22	6319,76	0,084681	1141,04	1071,686	1110,086	1107,604	0,031368	
AOA1D6BX	3	2	17,0915	0,024972	1,668903	MD	WK	Uncharact	18968,51	18634,9	18634,9	18634,9	0,060644	82311,17	14599,4	14696,62	12509,1	0,029617	21317,8	20967,4	21317,84	20767,49	0,021896	
AOA1D6S5H	2	2	10,3089	0,031197	1,267757	MD	WK	Uncharact	31,42122	105,5367														0,092223
AOA1D6CF	2	1	17,4623	0,032006	288,584	WK	ST	Patatin OS-Triticum aestivum PE-	26,20724	26,20724	26,20724	26,20724	0,02724	7256,841	116,271	161,271	161,271	161,271	0,028743	17,4713,0	14905,46	2150,917	2150,917	0,021612
REVERSE6	1	1	5,9775	0,0324	1,224545	MD	WK	Reversed S	44128,53	39579,61	37524,68	40414,77	0,083499	30597,84	36914,27	33053,8	33252,19	0,094987	3941,93	43331,7	40399,54	41048,39	0,049646	
AOA1D5S2	1	1	6,288	0,032535	1,420862	MD	WK	Uncharact	9352,941	59342,91	54373,84	49763,26	0,180529	33619,25	39552,6	36366,04	36591,85	0,081076	49584,53	48771,56	57350,91	51919,85	0,089854	
REVERSE2	1	1	5,8944	0,033411	1,187336	MD	WK	Reversed S	28736,53	29338,65	27954,03	28574,61	0,054075	26215,8	25810,66	30080,79	28780,0	0,027997	314395,5	331436,3	32509,06	32683,64	0,028634	
AOA1D5R9X	1	1	5,4446	0,034193	1,708403	ST	WK	Reversed S	9643,961	8523,205	8523,205	8523,205	0,027997	1020,02	20410,05	20416,43	20416,43	0,041647	21811,35	24771,31	22410,92	22997,86	0,0608403	
AOA1D5Z6I	2	1	10,4807	0,034294	3,818265	ST	WK	Uncharact	12507,63	11207,18	11207,18	11207,18	0,020168	880,917	851,927	1025,22	1026,93	0,010567	2080,917	21327,17	20987,22	20855,07	0,02338	
REVERSE6	1	1	11,9822	0,034336	1,379062	ST	WK	Reversed S	14512,79	14259,71	13616,06	14128,09	0,023702	78616,3	10827,27	12609,45	13212,7	0,021757	13485,25	131925,2	128357	12727,5	0,028357	
W5CD6V	1	1	13,032	0,044812	1,178211	ST	WK	Uncharact	11129,2	10417,93	9850,61	105051	0,04169	9828,25	11780,6	98456,8	96822,27	89616,41	81545,1	80727,9	80695,54	0,028084		
REVERSE1	1	1	4,5334																					

W5FRP9	1	1	5,4301	0,104971	19,91433	ST	MD	Uncharact.	3047,191	3278,952	3241,696	3189,28	0,039023			2180,955	2180,955	285,6194	118,6804	76,15008	160,15	0,691358			
REVERSE1 ^c	3	2	17,6623	0,105878	20,50724	WK	MD	Reversed S	881,3995	1402,127	750,789	101,1439	0,340694	34878,68	1493,14	2200,081	12857,3	1,483542	905,0561	349,7835	626,0527	126,9641	0,442828		
AOA1D6CY ^c	2	2	10,5342	0,106149	1,202938	ST	WK	Uncharact.	26932,38	24549,42	23936,2	25139,36	0,06296	23434,98	19848,36	19411,57	10983,9	0,105638	21375,25	24725,45	20346,56	22149,09	0,103377		
AOA1DSV ^c	1	1	5,4867	0,109528	14,59044	MD	WK	Uncharacterized prote	128,984	498,8404	313,9122	0,833125	103,3774	196,5373	269,9474	189,9541	0,439474	2800,998	1872,754	3640,786	2771,513	0,319098			
AOA1D5TY ^c	1	1	6,4217	0,110693	3,216582	ST	WK	Uncharact.	7389,206	7612,597	4863,884	6621,896	0,230534	28,54762	6147,476	3088,012	1,40114	6584,679	4967,292	5812,29	5788,233	0,139761			
REVERSE2 ^c	1	1	7,0554	0,112745	1,416072	ST	WK	Reversed S	551970,2	506392,3	482584,5	513649	0,068641	24887,97	39611,47	44317,2	362728,2	0,279406	435433,7	421155,2	454894,5	437161,1	0,038741		
AOA077S3 ^c	1	1	6,8518	0,112946	1,159628	ST	WK	Aspartate	60723,95	63277,92	62765,62	62255,83	0,021703	48028,59	6142,69	51586,77	53686,02	0,129439	52861,72	57862,4	54116,25	54946,79	0,047375		
AOA1DGAS ^c	2	1	13,1671	0,11585	1,657669	ST	WK	Uncharact.	51918,18	57307,46	54398,01	54541,22	0,049458	16582,36	42147,94	39976,77	3290,23	0,430825	46863,9	54382,26	48290,27	49845,2	0,080118		
AOA1D5TG ^c	1	1	5,3192	0,118906	1,39294	ST	MD	Uncharact.	10943,44	11091,91	11381,28	11138,87	0,01999	15214,12	9304,269	8872,322	11130,24	0,318352	7721,381	8886,841	7381,768	7996,663	0,098716		
P04727	2	2	14,9376	0,123596	1,906989	ST	WK	Alpha/beta	72469,15	75496,7	73955,5	73973,88	0,020467	15085,81	52558,12	48008,84	38790,92	0,516493	4341,27	49203,02	45328	45980,77	0,061649		
AOA1D5YY ^c	2	1	12,4334	0,124044	4,050529	ST	WK	Uncharact.	1293,062	1160,848	1149,43	1201,113	0,066467	35,33228	853,2779	444,3051	1,30175	855,2097	43057,5	115307	542542,3	581080,6	553111,9	558911,6	0,035628
AOA1D6G ^c	2	1	17,2477	0,126688	1,120933	WK	ST	Uncharact.	294318,4	284729,7	332805,8	303816,3	0,083439	33545,64	340922,5	345105,1	340557	0,013919	340765,6	311083,7	359598	33714,91	0,072545		
AOA1DXD ^c	2	1	12,5018	0,127806	4,869522	ST	MD	Uncharact.	859,9364	1458,0	820,1046	1046,04	0,341662	33,20298	136,249	584,0029	341,1583	1,31063	512,0934	244,2369	88,1309	21,8138	0,343575		
AOA1D5WH ^c	2	1	12,2262	0,129403	1,12553	MD	ST	Uncharact.	62255,3	62964,67	63565,52	62928,5	0,010244	71489,76	62985,58	57281,24	63920,19	0,111856	6893,64	72019,54	71524,58	20,02351			
AOA1D6CJ ^c	2	1	11,5489	0,131876	1,335579	ST	WK	Uncharact.	35452,95	37011,8	143624,1	379421,3	0,080725	210840,2	322710,9	318711,7	284087,6	0,223402	33577,2	294851,7	348516,5	323680,3	0,085906		
REVERSE1 ^c	1	1	6,101	0,133652	2,753338	MD	ST	Reversed S	2304,342	524,4856	1723,412	1517,413	0,598145	1289,35	1796,166	4912,101	2665,872	0,735867	4216,431	4324,677	3992,747	4177,951	0,040517		
AOA1D5XY ^c	1	1	5,7791	0,134491	19,78536	ST	MD	Uncharact.	797,013	331,4651	339,187	489,222	0,544912	2,57224	358,1459	170,1819	176,9667	0,015083	19,8933	43,75727	10,529	24,72647	0,692914		
P12299,A0 ^c	8	7	57,9332	0,134505	1,137177	ST	WK	Glucose-1-	59539,7	61712	602035,1	603383,5	0,014483	601156	498374,2	492626,8	530597	0,115307	542542,3	581080,6	553111,9	558911,6	0,035628		
AOA1D6C ^c	2	1	11,885	0,13465	1,357262	MD	WK	Uncharact.	38966,87	31281,46	41372,32	37206,89	0,141647	2229,72	25171,38	38031,23	2849,244	0,293795	3693,86	39442,18	33996,04	38761,79	0,046806		
AOA1D5WS ^c	1	1	6,1083	0,135157	4,295294	MD	WK	Uncharact.	10096,77	9166,839	12179,11	10480,91	0,141766	995,2492	6861,52	8152,81	5336,52	0,174487	1333,91	13420,54	13194,18	13316,21	0,080577		
AOA1D5SS ^c	2	1	11,6011	0,138018	25,73593	WK	ST	Uncharact.	14,4898	8028726	17,23635	13,25165	0,356741	21,2995	826,3961	11,882	349,5245	1,215169	20,17306	24,181	5,801339	16,71847	0,578077		
REVERSE1 ^c	1	1	6,1942	0,141918	65,98115	WK	MD	Reversed S	53,2108	89,2874	71,25191	10,35796	3678,313	1861,102	63,54858	1867,655	0,676733	52,6942	32,22342	44,58582	0,34092				
REVERSE7 ^c	2	2	15,3472	0,143153	1,22003	ST	WK	Reversed S	27801,34	26878,79	24099,26	26259,8	0,073386	2579,73	1957,87	19195,5	21524,37	0,172247	2085,62	2424,43	21940,96	22346,87	0,077402		
AOA1D6B0 ^c	1	1	12,527	0,148509	1,904287	MD	WK	Uncharact.	411912,4	423166,1	527822,1	454300,2	0,14076	8975,63	36087,6	349947,1	24799,71	576069	446,1747	538497,3	505525,8	0,053212			
AOA1D6CN ^c	4	2	33,187	0,151164	1,41913	MD	WK	Uncharact.	43779,14	40482,67	53207,3	45823,06	0,141419	47550,11	22047,35	37589,5	35729,0	0,359729	53611,49	50862,78	53305,9	5343,21	0,043234		
REVERSE3 ^c	1	1	12,2116	0,156903	2,152115	ST	WK	Reversed S	11834,11	11848,2	9123,73	10935,15	0,034147	1361,81	7690,582	6119,178	5081,21	0,560857	2836,059	10014,09	2781,794	8510,647	0,162936		
W4Z2WQ1 ^c	2	2	11,632	0,166747	1,3341	ST	WK	Uncharact.	56776,88	58375,65	41826,08	52326,51	0,174457	42380,25	35915,74	39370,7	3922,23	0,082474	39480,59	56658,74	46196,59	4745,42	0,182459		
W5FN32;A ^c	5	1	61,6321	0,168832	1,19508	WK	ST	Uncharact.	25031,04	23782,45	23053,87	23955,79	0,04174	2460,71	22398,68	18625,39	21874,93	0,131844	18328,75	22015,19	1972,907	20045,34	0,092601		
AOA1D5XH ^c	3	1	17,0289	0,168906	1,363548	ST	MD	Peptidyl-pi	141903,1	158143,9	12076,1	14027,0	0,136176	141945,7	141876,8	14054,53	102698,7	0,329072	12159,4	14399,67	124542,3	131219,5	0,084356		
REVERSE7 ^c	1	1	5,7652	0,172305	9,73055	WK	MD	Reversed Sequence	72,6559	72,6559	66,1202	66,1202	0,038763	484,847	508,824	480,824	480,824	0,037247	511,592	508,726	508,726	508,726	0,057826		
AOA1D6SC ^c	1	1	6,0301	0,174509	1,74889	WK	MD	Uncharact.	13,078	105,083	145,861	153,0273	0,031273	171,087	111,694	111,694	111,694	0,031273	116,7838	116,7838	116,7838	116,7838	0,016162		
REVERSE2 ^c	2	2	12,0597	0,207395	1,720464	MD	WK	Reversed S	16500,39	163579,8	20123,42	17660,86	0,120821	5900,618	19114,4	20726,73	15247,25	0,533504	20316,1	23474,1	20263,35	0,036809			
AOA1D6C1 ^c	1	1	6,5786	0,208107	1,240797	ST	MD	Uncharact.	1307,50	1307,50	1307,50	1307,50	0,041571	1307,50	1307,50	1307,50	1307,50	0,041571	109,509	109,509	109,509	109,509	0,009492		
AOA1D6D3 ^c	5	1	12,4865	0,208112	1,173792	MD	WK	Uncharact.	36455,11	36455,11	36455,11	36455,11	0,041572	36455,11	36455,11	36455,11	36455,11	0,041572	27,0595	27,0595	27,0595	27,0595	0,025545		
REVERSE4 ^c	1	4	22,7875	0,209552	1,33213	ST	MD	Elongation	2041,029	2158,673	2158,673	2158,673	0,087321	2427,366	306,973	305,4739	305,4739	0,087321	710,505	712,693	713,591	713,591	0,044447		
AOA1D5Z7 ^c	2	1	6,4973	0,209489	1,217748	WK	ST	Uncharact.	41912,37	41553,44	42881,77	42115,66	0,016131	62234,11	51149,79	517,233	517,233	0,016131	1,038124	1,038124	1,038124	1,038124	0,006382		
REVERSE3 ^c	2	2	11,2831	0,209519	8,352113	WK	ST	Reversed S	36693,7	30756,73	30927,59	32288,4	0,053639	1787,93	2432,559	6573,62	1349,96	0,676969	1308,443	851,3502	440,7166	866,8367	0,500572		
AOA1D6C ^c	5	1	6,5912	0,209740	1,056527	ST	MD	Uncharact.	12100,14	124643,3	13756,71	13735,15	0,060481	142491,4	12721,9	12716,7	12716,7	0,017936	24349,51	30927,1	3517,09	3262,33	0,026337		
AOA1D5Y3 ^c	1	1	5,8639	0,209948	3,513169	MD	ST	Glycosyla	85,4779	813,8816	723,7054	541,0222	0,037349	154,0306	1883,218	1018,624	1,200364</								

W5BV55	1	0	4,976	---	---	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1		
W5DWK3	1	0	6,9147	---	---	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1		
W5EOL9:W	3	0	18,6412	---	---	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1		
W5FSQ6	1	0	4,6347	---	---	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1		
W5IA07	1	0	12,8656	---	---	Uncharacterized protein OS=Triticum aestivum PE=4 SV=1		



Accession	12_R001	12_R002	12_R003	12_CV	Ave_Peptides	Replication Count	Rev count 1=SEARCH("REV",A2,1)]	Rev count 2=	Pept/Protein 1/3 Reverse	Pept/Protein 2/3 Reverse
A0A1D6RW1					2		0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	n=3	267 267
A0A1D6ARV8					1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	n=2	0	
A0A1D5UOC0	10206,63455	10336,49386	9977,026107	0,017892363	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0 0	n=1	2	
P33432	257932,1372	266725,9643	270626,3729	0,024528628	4	3 1 0 0 0	0 0 4 0 0	FDR%	1.2	0,7 Peptide FDR%
A0A1D5YDS6;A0A1D5Z2L2;A0A1D6A1G8	392897,1046	393855,9167	414181,7961	0,030030356	6	3 0 0 0 0	0 0 0 0 0	# reverses	29	
A0A1D5V0Y9;A0A1D5WPA6;W5CL3;A0A1D5X433;A0A1D6A1Q0;A0A1D6D20;W5DT55;W5EE00;W5FAY5	6	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	total protein	267					
O64393	74323,45593	77752,44587	7075,777694	0,051932132	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0 0	filtered 2/3 ; no reverse	238	
A0A1D5V8K8	11635,81564	12082,56519	10471,93278	0,072959188	1	3 0 0 0 0	1 1 0 2	total peptides	1089	
REVERSE29260	198301,2092	195913,5819	199821,9398	0,00949573	2	3 1 0 0 0	0 0 8 0	Ave Peptides/Protein	5	
A0A1D5XAR2;A0A1D5XAR1;A0A1D5XAR3	564678,1987	559831,6277	532959,9517	0,024555314	8	3 1 0 0 0	1 0 0 0	2 Peptide minimum	0,3 CV Maximum	30 %
REVERSE10072	16048,61989	16553,60365	16587,38578	0,018404963	1	3 0 0 0 0	1 0 0 0			
REVERSE74392	478038,1942	496396,3201	554973,3093	0,078817674	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5VF84	23644,28206	26553,18544	24583,35836	0,059556266	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D5WM80	53514,54489	46781,03133	47956,33435	0,07278114	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5XCE6;A0A1D5XCE7	12060,50629	10686,77505	13520,20633	0,0117206877	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5VJ7	230777,2613	225946,3631	234431,0258	0,018473082	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
B2Y2Q6	1004611,933	1125589,828	1130311,603	0,012212343	11	3 1 0 0 0	0 0 11 0			
A0A1D5V8W1;A0A1D5V8W3;A0A1D5WM92	1839904,448	1801226,934	1874614,043	0,019967253	3	3 1 0 0 0	0 0 3 0			
M9TGF7;P08453	45907,71242	47119,05646	47574,69963	0,018383224	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5VAT5;A0A1D5WCT3	28057,73853	268443,4848	289098,576	0,031542727	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
W5D616	1799,755388	1871,149507	1916,414871	0,03157973	3	3 1 0 0 0	0 0 3 0			
A0A1D5WFO;A0A1D5XF07;A0A1D5XF08;A0A1D5XF09;A0A1D5X163;W5E190	49,44062505	64,42320000	73,41315736	0,019399808	3	3 1 0 0 0	0 0 3 0			
A0A1D5WUQ0;A0A077RPL8;A0A1D6D1C6	401673,4995	383216,9474	369229,2919	0,042300599	12	3 1 0 0 0	0 0 12 0			
A0A1D5YEH0;A0A1D5YEH1;A0A1D5YEH2	31524,87441	32152,75083	32813,5455	0,020035168	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D5SS245	193447,4768	190074,3235	192796,4141	0,009314672	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D5SQM9;A0A1D5QN0;A0A1D5SDE5	10722,00605	10197,14737	9968,516533	0,02552529	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5UEA5	3434,18383	1819,758618	1209,721095	0,053475453	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D6C32;A0A1D6CC33;A0A1D6CC34;A0A1D6CC35;A0A1D6CC36	134914,842	124919,6418	142392,0384	0,065383948	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D6B080;A0A1D6B082;A0A1D6B085	446832,1172	466843,6188	467455,9074	0,025488645	25	3 1 0 0 0	0 0 25 0			
A0A1D5GG6;6IQQ39;A0A1D5X6G5	349589,3192	352360,5728	376701,1564	0,04189395	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
W5D70	1075882,74	1137989,712	1158124,164	0,038139401	3	3 1 0 0 0	0 0 3 0			
A0A1D5URU3	11865,80047	13828,41297	13548,22654	0,081515068	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D6RZK9	19347,05524	19328,93394	19382,18838	0,01399095	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
P17314	1071138,541	1087092,916	1071119,285	0,008562241	4	3 1 0 0 0	0 0 4 0			
A0A1D5SA86	881028,0729	863607,8183	894694,7465	0,071710385	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D5H4G4;A0A1D6A3Q0	1416,358261	1184,046567	1304,746636	0,08924813	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5UE55	123852,9791	116988,4373	139581,5165	0,091340845	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
REVERSE10101	9496,498304	11074,618	9460,688122	0,092066325	1	3 0 0 0 0	1 0 0 0			
A0A1D6A389;A0A1D6A391;A0A1D6A392;A0A1D6A393;A0A1D6A394;A0A1D6A395;A0A1D6A396;A0A1D5	277238,5936	281689,1289	286640,3517	0,024046403	3	3 1 0 0 0	0 0 3 0			
A0A1D6C415	10009,23889	10759,56316	11357,92398	0,06103339	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
REVERSE7083	644586,1667	639010,9207	650572,268	0,008968021	2	3 1 0 0 0	1 1 0 2			
A0A1D5HP6;A0A1D5SUL7	845,9615037	921,3837903	769,8335744	0,088959797	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5Z7G1	5083,958194	5074,237384	5255,971147	0,01989731	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D5WAY0	21737,94964	23534,1495	28323,47472	0,138768139	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D5TRCS;T1V18;T1V2Z1	207260,5019	204688,9161	209321,9506	0,011208597	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D6BQM7;W5HPC1;A0A1D6C4Q5	211490,4506	217402,634	231808,1782	0,04745207	5	3 1 0 0 0	0 0 5 0			
A0A1D5S346;A0A1D5WZV9	4370075,306	4432790,8	4747257,541	0,044747037	4	3 1 0 0 0	0 0 4 0			
A0A1D5VP8	33530,18039	31693,39814	29665,45996	0,056182009	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5YFA6;A0A1D5YFA7	328449,5468	340670,0375	306173,9089	0,053801047	14	3 1 0 0 0	0 0 14 0			
A0A1D6C286;A0A1D6CZ87	285718,8416	276130,3823	328204,9346	0,099416052	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D5WV12	162560,1012	175696,0685	208704,3147	0,130400217	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
REVERSE124618	75734,70488	73291,69732	858884,24078	0,085307754	3	3 1 0 0 0	1 1 0 3			
A0A1D6RUM0;A0A1D6RUM1	7038,288082	7560,175179	7429,309392	0,036980904	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D6RTR9;A0A1D6RT50	131780,7887	144229,0525	143947,1789	0,050769739	3	3 1 0 0 0	0 0 3 0			
A0A1DSSV4;P08488	237311,6266	273271,68	272455,88	0,022689544	13	3 1 0 0 0	0 0 13 0			
A0A1D5VQ02;A0A1D6RS26	1120546,282	1156331,288	1343745,758	0,099328355	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D659D0	1224910,7069	1324910,065	1308147,139	0,03348909	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5SN8;W4ZXB7;A0A1D5SK30;A0A1D5SL4;A0A1D5T2R7;A0A1D5T3X5;A0A1D5YEP4;A0A1D5ZCT8;	222104,085	219125,1159	208947,4674	0,031831669	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
REVERSE14344	2350201,551	2428374,848	2535463,704	0,038148441	1	3 0 0 0 0	1 0 0 0			
A0A1D5VCN0;A0A1D5WE9;A0A1D5WIF0	495771,1302	487266,2609	471028,9746	0,025933906	3	3 1 0 0 0	0 0 3 0			
A0A1D6R99	4885,906871	4285,768261	4792,630209	0,069379123	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5ZD7	8944161,9191	898194,9393	896318,3695	0,002251807	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5S561;P16315	18427,43652	18765,67049	19739,56795	0,035897933	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
REVERSE32775	373272,3585	336060,5399	321930,4894	0,077512686	2	3 1 0 0 0	1 1 0 2			
A0A1D5V5M8	639557,5458	595771,9895	60872,2709	0,036579239	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D6C083	512465,9506	520615,1633	504403,9445	0,018516053	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D6D575;P83207	1020860,729	1037407,155	1073514,7454	0,03283729	4	3 1 0 0 0	0 0 4 0			
Q0Q5D9	491739,2469	486463,6559	441682,04	0,058112576	11	3 1 0 0 0	0 0 11 0			
REVERSE8438	296124,989	296346,162	284946,0101	0,022828917	2	3 1 0 0 0	1 1 0 2			
A0A1D5UQB7;A0A1D5UB8	3416,380183	1700,381795	1066,977246	0,0589721831	3	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5YCJ4	154634,7364	158498,2582	157243,4771	0,012570177	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D5WR93	1588,708657	2147,378474	3557,300669	0,047298678	4	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D6A6D2	71634,96081	7275,72445	86079,89902	0,040593098	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D5S7P5;A0A1D5SP76;A0A1D5SP77	298342,0261	286265,0179	268369,06994	0,053038971	6	3 1 0 0 0	0 0 6 0			
A0A1D5ZP4	118436,248	120486,3747	130136,6949	0,051597698	2	3 1 0 0 0	0 0 2 0			
A0A1D5X5C6;A0A1D5Z536;Q5EWZ1;W5AH12	12277,6705	118530,0567	110862,1246	0,051444222	3	3 1 0 0 0	0 0 3 0			
P81713	946795,3181	986173,4137	910254,9657	0,04061634	4	3 1 0 0 0	0 0 4 0			
A0A1D5SR7L	6504,862355	6666,750948	6737,18001432	0,018001432	1	3 0 0 0 0	0 0 0 0			
A0A1D6B419	111331,5584	109744,0907	113702,7941	0,017852771	4	3 1 0 0 0	0 0 4 0			
A0A1D5Y5R2;W5E578;A0A1D5Y5R3;A0A1D5Y5R4	612537,5284	589384,1382	540704,2188	0,063119889	22	3 1 0 0 0	0 0 22 0			
A0A1DXI7										

REVERSE4464													
A0A1D5WMH8	12096,08646	12046,27933	12113,02494	0,002870919	2	3	1	0	0	1	1	0	2
A0A1D6C2R0	52746,1645	51326,92206	47979,44042	0,048289236	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6BN82	953,6660817	3,384374783	1,22187476	1,719565636	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WIN9	90900,08267	85451,98771	102926,3074	0,096045435	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W515X1;W5HSW8;A0A1D6CJL8	1367527,368	1295372,06	1329274,785	0,027127699	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE53378	542258,3839	537900,5402	511492,9631	0,031378028	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5VR46;A0A1D6AUB3;A0A1D6CKG6	316742,1336	307715,6601	263060,1814	0,0971612	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6D7F3	6664,98407	5905,994454	6373,526242	0,060632392	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W5FRP9	159,1401606	308,4295231	404,6807521	0,425524545	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE100305	3047,191486	3278,952448	3241,695566	0,039026599	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6CY36	881,3995221	1402,127347	750,7895599	0,340693774	3	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5V163;A0A1D6RN73;P94058;Q70MG9;W5EIR1	26932,38182	24549,4159	23936,29477	0,062959861	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5TY59	128,9840143	498,8404148	0,833124538	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE25364	7389,206222	7612,596841	4863,884456	0,20354315	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A07735V2;A0A1D5VDW6;A0A1D5WD8;A0A1D5WD9;A0A1D5WF58;A0A1D5WF60;W5DBH3	551970,3235	506392,3259	482584,5213	0,068641166	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5A6C16	60723,94877	63277,9179	62765,61571	0,021703167	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5T5G38	51918,18022	57307,45962	54398,01481	0,049457863	2	3	1	0	0	0	0	2	0
P04727	10943,43685	11091,90597	11381,27698	0,199900502	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5YYF8	72469,15368	75496,97261	73955,50016	0,020466592	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6ASM1	1293,06244	1160,847927	1149,429854	0,066467154	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5DX9;W5E7L8;A0A1D5XH24	294318,3266	284279,719	33280,7579	0,084395359	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5WH34;A0A1D5WH38	859,9363661	1458,08017	820,1045607	0,341622037	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6C136	62255,35359	62964,67168	63565,52071	0,10421849	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE12910	354525,9463	370113,7739	413624,116	0,087024928	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5XY1	2304,34267	524,485550	1723,412131	0,58145435	1	3	0	0	0	1	0	0	0
P12299;A0A1D5CN8;A0A1D5CN9;A0A1D5CP0;W4ZRH9;P12300;A0A1D5CN7	797,0132669	331,4651338	339,1877205	0,544912054	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CAE0	595397,5247	162717,9717	602035,1127	0,014482665	8	3	1	0	0	0	0	8	0
A0A1D5WS28	38966,87303	31281,4647	41372,32005	0,145617293	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5SD01	10096,77243	9166,838931	12179,1102	0,147166434	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE100487	14,48985728	8,028726034	17,23635319	0,356713984	2	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE7359	53,21507683	89,28873859		0,357996462	1	2	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6B071	27801,3425	26878,78829	24099,26237	0,73385912	2	3	1	0	0	1	1	0	2
A0A1D6CM14;A0A1D6C4W1;A0A1D6CM15	411912,4296	423166,1213	527822,1446	0,140699884	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE39966	43779,14058	40482,67187	53207,36807	0,144119349	4	3	1	0	0	0	4	0	0
W4ZWQ1;W5AKV2;A0A1D5SNK6	11834,1097	11848,20076	9123,732044	0,143742425	1	3	0	0	0	1	0	0	0
W5FN32;A0A1D5YU92;W5FM07;W5FNH7;W5FP48	56776,8809	58376,56294	41826,07919	0,174457381	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5HK8	25031,0408	23782,45158	23053,86826	0,041704158	5	3	1	0	0	0	0	5	0
REVERSE73022	141903,0875	15813,8488	120765,0762	0,133617685	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D6CD03;A0A1D6CD4	22,65397202	116,1201643	0,952491293	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0
REVERSE68779	49847,86046	50872,01148	53614,7711	0,37859954	4	3	1	0	0	0	4	0	0
A0A1D6BUY8;A0A1D6DD7	71,51788974	67,39800934	0,041941857	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A077RU09;A0A096U77;A0A096KE9;A0A096UT7;A0A0C4BIL4;A0A1D5RPL4;A0A1D5RUC8;A0A1DSR	159624,0978	187977,5199	182901,33	0,085498386	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5XQ9;A0A1D5XQ4;A0A1D5XQ6	1401372,4439	1496517,611	1320469,267	0,062669090	7	3	1	0	0	0	0	7	0
REVERSE9448	2655812,799	2729193,439	2648099,063	0,16715669	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6DKU4	5698,132514	5698,412837	10297,62437	0,367207979	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE9622	1106,856228	1096,482841	1138,082954	0,19441115	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5SW23;A0A1D5SW25;A0A1D5SW26;A0A1D5SW27;A0A1D5SW28;W5AD18	1372,396585	2092,102948	1173,084831	0,31273304	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6COY5;A0A1D6SCF2	636,7240623	4242,420764	3137,326555	0,248876443	3	3	1	0	0	0	0	3	0
REVERSE17155	3983,73695	4154,066654	3814,697109	0,042589878	1	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE9847	1979,225923	1552,071425	2068,681436	0,147051114	2	3	1	0	0	1	0	2	0
REVERSE106807	12307,31472	2226,083393	448,0836349	0,187031549	2	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE79905	36455,10595	36988,83038	38676,12936	0,031021666	3	3	1	0	0	1	1	0	3
A0A1D59P23	133872,014	131350,2017	128323,3152	0,021178068	10	3	1	0	0	0	0	10	0
REVERSE77889	254002,4374	265800,7737	307680,6609	0,027021778	2	3	1	0	0	1	1	0	2
REVERSE20796	16500,38754	16358,78654	20123,41717	0,120821312	2	3	1	0	0	1	1	0	2
A0A1D6C183;A0A1D6CJ9;A0A1D6CJL6;A0A1D6CY4	130750,1284	13979,9087	11812,17476	0,077504551	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6D384;A5A4L4;D0EWS4;D6QZM5;D6QZM8;P0C206	196417,4907	185311,8558	179350,122	0,046313832	5	3	1	0	0	0	0	5	0
W5GX0	9178,758432	7476,836256	12259,94879	0,251504191	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W5FQ7	36,02945139				1	1	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE121344	219,4576972	77,97407578	126,9262133	0,059755812	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5XG59;A0A1D5XG60	42653,35773	41435,52294	38837,34534	0,047569281	9	3	1	0	0	0	0	9	0
W5CEA4;A0A1D5X07;A0A1D5X08;A0A1D5YJ4	421574,629	438543,4758	42341,6754	0,021761706	29	3	1	0	0	0	29	0	0
A0A1D5X514;A0A1D5X515;W5EE13	161,26943909	1032,415763	725,9374836	0,690610565	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6S74;A0A1D6S75	37172,20241	33296,19598	24395,55658	0,027016734	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE14108	28847,63245	28425,63827	32986,23256	0,083762533	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE15487	100718,2648	100488,0332	92010,04562	0,050773765	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D5ZV71;A0A1D5ZV5;A0A1D5ZV6;A0A1D6DDM8;W5FZH6	16178,85784	16869,11054	17242,89914	0,015926327	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6B6H5	8401,029122	8320,000578	7158,672786	0,021178087	4	3	1	0	0	1	1	0	4
A0A1D5R81;A0A1D6CR1	243,6017677	25096,1677	30229,60114	0,092931591	3	3	1	0	0	0	3	0	0
REVERSE15204	3861,896202	3921,253449	3790,819692	0,016927097	4	3	1	0	0	0	4	0	0
W5DX22;W5ETW6;W5EGQ0	2118,971688	3562,125247	4448,912529	0,348269601	1	3	0	0	0	0	0	0	0
Q00M56	2372,346036	2654,061168	2812,093314	0,028526888	9	3	1	0	0	0	0	9	0
A0A1D6BUF1;P0C207;P0C208;P0C211	25297,33666	245324,1047	273389,1745	0,0536398905	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5NM8;W5F9B5	48206,3276	47986,75163	41409,87688	0,084201115	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE68711	23496,71344	22804,1961	31408,62102	0,184549226	1	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE53042	23955,9372	223385,6743	250395,7713	0,051764876	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5TB6;W5F6H2	109439,341	97758,60816	90706,153	0,095276993	4	3	1	0	0	0	4	0	

REVERSE65742	54912,85236	59673,53844	52918,30232	0,062160491	3	3	1	0	0	1	1	0	3
AOA1D5XD3;AOA1D55XD4;AOA1D55XD5;AOA1D55XD6;Q03968;W4ZN68	7200,982332	6633,980824	10682,53486	0,268236625	5	3	1	0	0	0	0	5	0
REVERSE59562	1969,704695	2128,711966	2062,755917	0,038898829	1	3	0	0	0	1	0	0	0
AOA1D5XMK2	17430,52931	17895,57166	16829,80494	0,030734058	2	3	1	0	0	0	0	2	0
AOA1D6B7D4	5545,778968	4763,600686	4596,752947	0,101972272	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE9407	67608,61201	66569,94895	56429,0272	0,097213943	3	3	1	0	0	1	1	0	3
AOA1D5RV86;AOA1D55939;W4ZRV5	29317,02497	24464,78802	23721,29004	0,117629877	3	3	1	0	0	0	0	3	0
AOA1D5W323		181,542656			1	1	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5SNPO	37348,4735	36042,89925	31330,14059	0,09069288	3	3	1	0	0	0	0	3	0
AOA1D6DIE4;AOA1D6DIE5;AOA1D6SAR6	13413,71595	13804,59199	21238,07807	0,27296063	3	3	1	0	0	0	0	3	0
AOA1D6AGT9;AOA1D6BEIX1;P12783;W5H4V7;AOA1D6A GT8;AOA1D6AXU9	22099,96368	22913,70905	22699,1441	0,018685518	4	3	1	0	0	0	0	4	0
AOA1DSURA1;AOA1D5RRC9;AOA1D5RU24;AOA1D5RYL0;AOA1D559K3;AOA1D5T0X9;AOA1D5T746;AOA1D5T709	3167,601255	3072,447914	2783,77256	0,066450781	4	3	1	0	0	0	0	4	0
AOA1D5UPS9;AOA1D5UPT0;AOA1D5UPT1;AOA1D5UPT2	6432,465552	7201,286203	6986,203415	0,057708174	2	3	1	0	0	0	0	2	0
AOA1D5D15;AOA1D5S16;AOA1D5SUT4;AOA1D5SUT5;AOA1D5YGG9;AOA1D5YGH0;AOA1D5ZB54;AOA1D5ZB55;AOA1D5ZB56;AOA1D5ZB57	550,1886775	715,0659784	378,6036377	0,307037987	1	3	0	0	0	0	0	5	0
AOA1D5V6K5	178410,8183	145948,1773	163736,2461	0,09991607	4	3	1	0	0	0	0	4	0
AOA1D5V6V1	19007,65494	18812,6459	16151,85215	0,088683868	2	3	1	0	0	0	0	2	0
AOA1D5XPB2;AOA1D5XPB3	26996,22186	29939,62767	35835,72916	0,145557349	1	3	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5VFC5;AOA1D5VU68;AOA1D5WEY7;AOA1D5WEY8	7104,106217	7814,438483	6891,62115	0,066474387	2	3	1	0	0	0	0	2	0
AOA1D5VPJ3;P01084	169,6936898	52,35320353	116,6336146	0,520486857	2	3	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5TS27	19093,20111	18828,23555	19155,96047	0,091422786	3	3	1	0	0	0	0	3	0
AOA1D5TSR5;AOA1D5TSR6	12888,12844	12310,67995	11559,73644	0,054361369	6	3	1	0	0	0	0	6	0
AOA1D6CNS5;AOA1D6CNS6;AOA1D6CCD8	220307,8946	222791,9756	234808,62	0,034318853	1	3	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D6AQ2	60838,0939	54077,35423	55445,60908	0,06294421	3	3	1	0	0	0	0	3	0
AOA1D6A2T8;AOA1D5ZWJ6	95616,94817	88981,71309	84008,442	0,065047211	1	3	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5WG42;AOA1D5WG43;AOA1D5WG44;AOA1D5WG46;AOA1D5WG47;AOA1D5WG48	109765,2387	120316,56556	124745,5169	0,065066837	5	3	1	0	0	0	0	5	0
AOA1D6AID0	23432,81521	18251,95091	25400,81898	0,165138386	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE111267	2787,542489	2473,566738	3212,901148	0,131365045	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W4ZUK2;W5AB71;AOA1D5T345;W5AM18	3284,246146	2504,494994	3991,381179	0,228137812	1	3	0	0	0	1	0	0	0
	4891,226305	3822,635951	2417,674296	0,334342521	2	3	0	0	0	0	0	0	0

A0A1D5T499	1568854,839	1358945,972	1657275,626	0,100259277	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5Y4V2;A0A1D5Y4V3	1233296,911	1360959,546	1306462,418	0,049266616	1	3	0	0	0	0	0	0	0
P10388;P08489;P02862	2600366,643	2961552,608	2756013,137	0,065340664	8	3	1	0	0	0	0	8	0
A0A096UU01	21187,44436	18023,28415	17249,60098	0,110857415	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE79719	40374,6108	34987,80558	42411,54196	0,097706651	1	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D5SA64;A0A1D5SCA6	46671,86108	45691,42107	45195,3432	0,01638683	2	3	1	0	0	0	0	0	2
P01083;A0A1D6BDS6;A0A1D6	2645565,188	2962730,976	2818068,256	0,0567532	9	3	1	0	0	0	0	9	0
A0A1D6AMX5	328647,3091	304751,5419	341817,7768	0,057802407	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6AAC8	243500,2141	209834,5836	25369,7967	0,076520446	1	3	0	0	0	0	0	0	0
Q41560	461393,6288	434988,8317	493674,6461	0,063433146	2	3	1	0	0	0	0	2	0
B2Y256	1105744,371	1294921,806	1199641,55	0,06034195	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D5YT4L;A0A1D5YT6;A0	2794,657503	3113,217065	2974,695783	0,053947238	1	3	0	0	0	0	0	0	0
P21292	76140,1963	700489,2212	782098,8855	0,05671859	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5XS09;A0A1D5XS10	530361,1495	612741,4359	557065,1009	0,074164468	23	3	1	0	0	0	0	23	0
A0A1D6RV16	35463,81557	38756,68332	37307,04208	0,044393058	2	3	1	0	0	0	0	2	0
W5FAG2	561031,3042	544922,1161	564793,3368	0,018953682	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5XGF5;P82900;A0A1D5	346734,9222	388515,7356	363635,4864	0,057377261	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5TE41;A0A1D5TVB0;A0	105121,1928	107006,5053	111933,1518	0,032559503	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A015Y107	18860,73849	21447,13191	18787,40282	0,076903053	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5SU52;P42755;W4ZQK	585,6631373	604,6761809	517,8418141	0,080166264	2	3	1	0	0	0	0	2	0
Q8LC6;A0A1D5XP27	469710,4682	509386,2747	480129,871	0,042288869	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A01D5V605	63366,78779	6930,8033	71075,46578	0,058879164	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6B7P2	37947,3413	38656,9129	35344,47484	0,046737519	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5YMH9	144463,6451	168670,1272	151286,1046	0,080625399	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5M475	492752,0347	552522,9075	494144,178	0,066480832	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5ST37;A0A1D5ST38;A3	464941,9903	494423,2592	498530,5594	0,037702592	5	3	1	0	0	0	0	5	0
Q10464	508484,3715	567228,8592	533336,2016	0,054978979	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5S029;A0A1D5S028	372296,9084	438130,9856	384308,742	0,088036271	19	3	1	0	0	0	0	19	0
A0A1D5Z1A0;A0A1D5Z1A1;A0	113343,9021	129777,7756	118114,6236	0,070212198	12	3	1	0	0	0	0	12	0
A5A4L5;A7XUQ5	13,93967422				4	1	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D6RX06;A0A1D6RX08;A	97252,85569	114029,9208	99410,75467	0,088131615	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5XC7;A0A1D5XC8;A0	26819,24658	23379,5621	24476,64756	0,070586397	14	3	1	0	0	0	0	14	0
A0A1D6SC9	43849,51985	39168,04868	34277,34491	0,122421385	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W5F9V7	1148857,827	1361511,887	123671,898	0,085776305	2	3	1	0	0	0	0	2	0
W5AX8	48431,73173	42444,37419	49888,43858	0,084079446	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5XGF3;A0A1D5XGF4;A	52858,89844	50985,11135	54592,44059	0,07152909	11	3	1	0	0	0	0	11	0
P16159	404190,2091	486709,8791	424121,8672	0,098229883	6	3	1	0	0	0	0	6	0
P01544;Q9TOP1;A0A1D5HZC	1796596,642	2083695,792	189950,469	0,075495339	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A01D5V1P3	24371,49454	23001,98993	25456,09972	0,050658314	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE15679	34682,6598	43417,00849	36927,82873	0,118296069	2	3	1	0	0	0	1	1	0
A0A096UKH3	556,1786462	603,6920615	704,6374919	0,155851084	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A0C4BJ13;A0A1D5XC6;A0	129826,756	144647,1933	137925,5248	0,05398315	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5YML1	3244710,23	3037316,195	3502546,426	0,071460584	1	3	0	0	0	0	0	0	0
Q00M61	218924,7793	214321,0279	182440,2668	0,096814646	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5VIE7;A0A1D5YIE8	52338,82573	52979,3846	54767,91646	0,023592505	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5S1Q3;A0A1D5S1Q4;A	86081,15126	88956,07727	92888,33256	0,038263416	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5Z5F6	283778,9067	261435,6984	291571,0403	0,056079683	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5TKG5;W5BNJ7;W5C5I	145536,7991	167412,1895	150898,9349	0,073741121	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5SKS6;A0A1D5SKS7	47600,35821	56809,74151	52005,41376	0,08834419	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE15652	10339,9343	7540,369384	11563,43242	0,210130502	1	3	0	0	0	1	0	0	0
I0T65;P04723	23143,94415	19509,28719	17435,99896	0,144252731	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D64U0;A0A1D6CDM3;A	186529,6555	208076,1063	192996,373	0,056448494	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D6B821;P16850	260673,7279	279339,7169	278597,5376	0,038732983	4	3	1	0	0	0	0	4	0
REVERSE1342	263289,361	313825,8893	282052,4793	0,089197674	2	3	1	0	0	0	1	1	0
A0A1D6A9A5	630,3094153	811,5966444	739,0039263	0,12550829	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6CWE4	138382,9961	153812,7979	137360,5199	0,064377027	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D6AMZ6;A0A1D6B2K0;A	18940,76976	21148,94028	20795,17926	0,060319691	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5V14;A0A1D5WWG7;	35853,45785	41329,14261	36112,84166	0,081801189	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5V1P43	369894,7924	435112,0022	396000,8886	0,081991162	3	3	1	0	0	0	0	3	0
P32032	339274,626	400016,5835	359100,9564	0,084601325	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D6ABR8;A0A1D6ABR9	16947,05669	14630,8902	16804,49833	0,080486517	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5Z1F1	50163,18036	44403,08484	47531,82728	0,060879594	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W5EG36	5985,881949	4435,543877	5698,42533	0,153486588	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE71238	63636,38082	47225,97365	58912,5053	0,149276438	3	3	1	0	0	0	1	1	0
A0A1D5V576	11323,109	14152,27958	11767,9966	0,12524616	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5XKJ8;A0A1D5XW56;V	109584,6219	122137,9511	113629,7178	0,055660845	14	3	1	0	0	0	0	14	0
REVERSE14820					1	0	0	0	0	0	1	0	0
REVERSE127228	3164,373144	3835,238224	3414,693501	0,097657831	1	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D5W59	172,5702734	52,36523548	34,4960913	0,86834688	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6C90	164597,6103	161705,367	170934,5065	0,028480314	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5Z7U0	5339,284659	6395,397171	5887,695465	0,089197551	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5XQ01	232028,0117	227292,8592	240239,3157	0,028091419	12	3	1	0	0	0	0	12	0
A0A1D5UV6	4082,727575	4313,735868	4627,95569	0,063036395	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5YW63	107450,3936	112428,4057	113421,8221	0,028799413	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE45615	2608,111309	8226,00125	3311,503029	0,649115292	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5TU5	72814,30581	81355,50389	71817,58808	0,069597651	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5SB97	76520,06217	74546,94937	69032,50574	0,054934863	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE59204	197396,1915	197565,0766	207405,9017	0,037935021	2	3	1	0	0	0	1	1	0
A0A1D6ALN8;A0A1D6B3W3;V	557641,677	498858,2586	580880,8639	0,077456757	1	3</							

A0A1D5X8Y9;A0A1D5X8Z0;A0	147352,4733	168129,0169	156037,6451	0,066389906	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6DAN1	54442,90609	67119,1463	59727,95239	0,105365123	1	3	0	0	0	0	0	0	0
Q6SPZ3;I0IT51	279888,7726	246067,4361	249655,9422	0,071856895	5	3	1	0	0	0	0	5	0
P10387	2185167,421	1975737,407	2266565,347	0,07002948	15	3	1	0	0	0	0	15	0
B1GXL6	99163,03264	117994,6259	104111,0631	0,091164138	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5YV0;A0A1D5ZG58;A	84870,40421	111070,6192	97771,1109	0,133810747	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5W9D9;A0A1D5W9E0	245021,7946	279387,0685	253919,5171	0,068747338	6	3	1	0	0	0	0	6	0
W5ACP2;W4ZT34;W5A558	53858,34243	55558,70298	56379,25522	0,023265715	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5S2A7;A0A1D5S2A6;A	303977,5462	344976,3092	307439,5134	0,071321851	6	3	1	0	0	0	0	6	0
A0A1D6BR39	70754,33789	57805,31585	77098,72425	0,143441434	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5DD4;A0A1D5DD5;A	349889,3759	374662,3226	379883,7806	0,043526526	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5UE03	6718,377401	8441,07928	6917,15844	0,12807325	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6B1M3	40924,1822	47035,44731	41787,0014	0,076476478	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5V7H4	108641,8674	103066,8714	121772,285	0,086394601	4	3	1	0	0	0	0	4	0
REVERSE57600	37,82552947				1	1	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE47178	16792,60245	19253,17324	17592,74042	0,07019773	1	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D5WWL8;P01085;W5Dk	6076,431634	3437,655477	5419,676821	0,275965445	7	3	1	0	0	0	0	7	0
A0A1D5UW10	201783,6298	184092,604	164567,9686	0,10456374	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5ZWY2;A0A1D5ZWY3;	1706,586325	336,902951	2224,620488	0,685562562	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WD68;A0A1D5WD66	46311,53156	38206,07104	46884,27142	0,110808495	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6BM26;A0A1D6CQ84;	492,2447483	541,9356494	243,6410557	0,375214355	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WVG4	60226,57048	48949,73075	61669,6344	0,122298581	1	3	0	0	0	0	0	0	0
P02861	756439,4062	908712,20157	776370,7113	0,101694521	3	3	1	0	0	0	0	3	0
W5GXK6	75023,00279	5457,08004	79858,24752	0,192253048	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6BF91	94970,94184	85093,58198	92516,4998	0,056600418	2	3	1	0	0	0	0	2	0
Q94G92;A0A1D6REQ9	250048,3813	147759,3353	272444,7836	0,297523403	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5WDT5;A0A1D5W859	76192,85349	80970,85442	79651,51056	0,0807258947	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5X4W1	14368,40919	16061,89867	14816,95618	0,058173672	3	3	1	0	0	0	0	3	0
REVERSE90489	41051,8517	43392,05455	52075,4311	0,127630175	1	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D6CHE0;A0A1D6CHE2	4131,631343	5412,016554	4426,603416	0,143984855	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5V617	40551,7779	34028,857	39281,96132	0,091115816	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D6AFZ2	31235,304	250754,5317	340191,5339	0,152223783	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6BPP8;A0A1D6CRM1;\	9129,44422	98631,27378	95782,21656	0,038883161	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE45014	1583,908546	609,550529	1838,018794	0,482555016	2	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D6BR50	3162,026034	3793,355343	3058,745173	0,119135667	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5VX2;W5DU6;A0A1D:	175388,6031	204690,4527	182083,2388	0,081938083	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D6B2E2	22524,80338	20692,74598	23139,87459	0,057551997	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5ZDV7;A0A1D5ZDY2	9411,545079	14482,1581	9133,37261	0,273506079	4	3	1	0	0	0	0	4	0
REVERSE11614	4959,773578	5470,438849	5385,710311	0,051910832	2	3	1	0	0	0	1	1	0
P04726	6985,577924	4894,213578	4676,265185	0,231038979	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE92699	826,2335049	867,7822098	716,7882465	0,097062706	1	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D5WSAO	319,9327285	184,1058574	320,9408321	0,286233719	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE82133	46194,95643	42005,87321	47218,08323	0,061181542	1	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D6BRM9;A0A1D6BRN0;\	57123,10601	68391,38957	61285,67227	0,091507009	5	3	1	0	0	0	0	5	0
W588A7	16287,51531	11067,40094	17954,82034	0,237908406	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE843	64271,56697	54806,91818	64328,90279	0,089653595	2	3	1	0	0	0	1	1	0
A0A0C4B186;A0A1D5XE80;A0	19180,86742	22596,87204	19787,42477	0,088810471	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6D361;A0A1D6D362;A	7453,397509	7698,130782	7558,378569	0,01621904	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE25348	162832,5649	153080,4247	175821,6166	0,069604166	3	3	1	0	0	0	1	1	0
A0A1D5VPL6;A0A1D5VPL9;A	93532,27542	97873,82321	97627,0755	0,025310107	3	3	1	0	0	0	0	3	0
REVERSE68704	8071,523653	6694,983555	58992,89649	0,098547576	5	3	1	0	0	0	0	5	0
P06659	224005,7761	176591,9382	226995,4412	0,135168649	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D6C4E8;A0A1D6C4E9;W	121549,5208	134734,2326	126833,4205	0,051958567	5	3	1	0	0	0	0	5	0
REVERSE14148	212984,1932	241414,2347	221229,1528	0,064948234	4	3	1	0	0	0	1	1	0
W5E19	69733,80805	80219,50313	72775,82443	0,072661718	2	3	1	0	0	0	0	2	0
W5H3A0	254134,7392	199478,4915	254768,9825	0,134430071	1	3	0	0	0	0	0	0	0
P04729;Q8W3V5	71865,30562	65143,55652	58992,89649	0,098547576	5	3	1	0	0	0	0	5	0
P81496;Q43691;Q43723	32066,68646	14711,51898	37359,46647	0,422423962	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CV2	27399,82816	26709,85043	26353,14562	0,026181996	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CWE1;Q2A784;A0A1D	12727,0936	12547,5834	129587,8525	0,016158914	5	3	1	0	0	0	0	5	0
REVERSE63130	66254,86498	66006,79145	67544,17604	0,012392583	1	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D6AC24;A0A1D5W4W2;	30437,78622	34175,95896	32775,2254	0,058175323	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5WNG5	1141,039856	1071,685657	1110,086048	0,031368313	7	3	1	0	0	0	0	7	0
A0A1D6BX91;A0A1D6BX90	206964,9433	206154,94107	213174,8235	0,018396427	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5ZL87;A0A1D5ZL88	37383,16407	31972,02766	40556,0125	0,118468988	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WHT8					1	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5TP97	22909,86568	14905,46499	21502,70438	0,216128894	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5V9F1;A0A1D5WKG1;	152806,4227	92376,31218	132632,8682	0,184230209	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A032768;A0A1D6AJC3;K7	67871,69072	68828,85444	65175,27305	0,028153908	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5X8X8	5724,030177	11576,38064	7703,108313	0,357168966	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5U4C8	8865,67295	8736,87901	8642,449654	0,012813942	1	3	0	0	0	0	0	0	0
P10386;P04730	45521,75959	37598,09498	52667,04974	0,166536545	8	3	1	0	0	0	0	8	0
A0A1D5SSB3	46923,12947	56006,36667	49472,70707	0,092222692	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6CFV3	8,896595356	56,33788785	10,0416678	1,078663286	2	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE65571	39413,92763	43311,69709	40399,53995	0,049645962	1	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D5SS2W3	49854,30063	48771,55671	57350,00206	0,088953917	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE22959	32953,9555	31439,3964	31346,3407	0,028634383	1	3	0	0	0	0	1	0	0
A0A1D5RNN1	41129,75959	25359,03495	38606,90771	0,241819273	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WEM4	10243,09622	10256,29955	11008,59946	0,041722911	1	3	0	0</					

A0A077RTB0;A0A1D5VU95	3498,710911	4372,654071	3561,801225	0,127886004	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE40639	41038,50191	50078,92154	42302,09972	0,110081154	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D6BV11;A0A1D6D1B0;P	207200,7316	177818,7696	224999,0553	0,117173308	5	3	1	0	0	0	0	5	0	0
REVERSE45973	10441,79311	7689,710054	10665,5565	0,172652172	2	3	1	0	0	1	1	0	2	0
A0A1D65S85	11973,57116	9858,866375	13528,68265	0,156273773	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6DI3	77994,47135	84759,9226	84822,6707	0,047552155	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5TK48	49365,43461	56418,50131	51799,56548	0,068201703	5	3	1	0	0	0	0	5	0	0
REVERSE60851	190058,0267	160102,6979	143767,8935	0,14259147	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D5VV16	2653,107289	2766,038061	2824,70505	0,031738978	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
P24296;Q8GZB0	84847,66052	34178,66484	142089,874	0,620286608	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6DII5;A0A1D6RXD5;A0C	853411,1004	970284,49498	889804,7166	0,066436222	12	3	1	0	0	0	0	12	0	0
A0A1D5T317;A0A1D6RERO;A0C	68153,3978	47181,339	72203,29673	0,214850109	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5SE57;W4ZQ59	67887,40955	64632,78953	69035,47089	0,033992627	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE98744	34957,19147	16553,8301	38836,50301	0,395278102	2	3	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D5VZ20;A0A1D5WHX8;V	179483,8812	132797,562	194476,8966	0,190434914	2	3	1	0	0	0	0	0	2	0
A0A1D6L0LY4	3582,994802	2205,498758	3860,533798	0,275576013	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
A0A1D5X0F1;A0A1D5Z0I9;A0	9329,310291	10565,00363	8703,23072	0,099383492	4	3	1	0	0	0	0	4	0	0
A0A1D5WMB8;A0A1D5RU21;	44133,03531	45795,35061	42883,03511	0,033002	4	3	1	0	0	0	0	4	0	0
A0A1D5ZG7	429183,5572	374534,978	442470,8289	0,086677005	5	3	1	0	0	0	0	5	0	0
A0A1D6CC40	382300,4398	380346,5458	411934,5821	0,045208267	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
P30569;P30570	101690,0177	117508,2614	104436,6893	0,078348371	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5Y2R0;A0A1D6RWF8;A	1606477,584	16464638,104	168869,8993	0,07143605	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
REVERSE82464	30219,42823	33541,05129	30686,96353	0,0571125	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D5TIF8	12512,38307	12894,71573	12732,79971	0,01509528	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WP4	11949,34887	8397,923794	12541,216	0,204408907	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE12788	4955,334505	3907,412644	5009,372691	0,134342551	5	3	1	0	0	1	1	0	5	0
A0A1D5Y0V2	101769,786	94246,39325	105846,1486	0,058483148	4	3	1	0	0	0	0	4	0	0
A0A1D5WL94	944402,7483	992775,3721	1018122,191	0,038020762	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5SC67;A0A1D5SC68;W	90552,43647	104634,1246	87539,03073	0,096827567	6	3	1	0	0	0	0	6	0	0
A0A1D6A2L5;A0A1D6A2L6;A0C	147926,4939	177568,7854	156018,2606	0,095460987	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5SA31	13578,62793	14637,66125	16392,36974	0,095573281	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
W5BKTO	133015,4163	100530,0339	133469,7214	0,154391085	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
W5CQ52					1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CY1;A0A1D6BX05;A0C	3253,831205	3980,822814	3356,496238	0,111448208	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5UFU8	2661,257357	3179,704162	2801,684723	0,093076876	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5ZJ2	5379,18988	4059,055622	3708,730338	0,201012192	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6DG9V	284992,9149	195173,3457	313050,9702	0,232886146	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D6REH6;A0A1D6REH5	39418,3724	44756,50773	42498,02747	0,063464065	7	3	1	0	0	0	0	7	0	0
W5D952	1742,54294	1807,09083	2069,40885	0,092427346	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE4464	16096,77954	17620,46409	17691,71461	0,052576783	2	3	1	0	0	1	1	0	2	0
A0A1D5VMW8	42862,05894	45684,55145	46636,91373	0,043565613	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6C2R0	2995,665047	2197,862978	2863,657646	0,159222519	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6BN82	98299,45573	87581,67681	97859,87064	0,064125372	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WIN9	118542,9105	1026546,489	979710,4341	0,10314932	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
W51X51;W5H5W8;A0A1D6CJ1	433889,1289	490929,8466	450499,3732	0,063994482	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
REVERSE55378	283934,8291	356967,7956	285162,2702	0,13546278	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D5VR46;A0A1D6AU3B3	6998,763169	7140,796109	7429,237789	0,030509025	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6DTF3	78,82009728	177,394099	126,2489191	0,386695954	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
W5FRP9	285,6193587	118,6804264	76,15007972	0,69135819	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE100305	905,0561271	349,7835247	626,052676	0,042282856	3	3	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D6CY36	21375,25364	24725,44555	20346,56303	0,103377123	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5VJ63;A0A1DGRN73;P5	2800,997872	1872,754372	3640,785735	0,31909809	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5TY59	6584,679241	4967,29226	5812,728514	0,139761413	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE25364	435433,6773	421155,155	454894,4531	0,038740526	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A077S3V2;A0A1D5VDW6;A0C	52861,7166	57862,3951	54116,2462	0,04735015	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6AS82;A0A1D6AC16	46863,07564	54382,2627	48290,27149	0,080117691	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5TG38	7721,38173	8886,840528	7381,767978	0,098715666	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
P04727	43411,27234	49203,02282	45328,00424	0,064168934	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5YF8	855,121313	938,9456092	890,4390359	0,046921837	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D6AM51	340765,6459	311083,6879	359598,0011	0,072545108	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5DX9X;W5E7L8;A0A1D	312,0734063	244,2369074	88,13094557	0,534574719	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5W36;A0A1D5W3H8	68939,6364	72019,53649	71524,57874	0,023351235	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D6CJ36	335772,7473	294851,7208	348516,4822	0,085906499	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
REVERSE12910	4216,430889	4324,676604	3992,74656	0,040516884	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D5XE1	19,893124	43,7572793	10,52900064	0,692913864	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
P12299;A0A1D5CN8;A0A1D	54254,3461	581080,5915	553111,853	0,035628143	8	3	1	0	0	0	0	8	0	0
A0A1D6CAE0	36603,85647	39442,17816	39969,04211	0,046806083	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5WS28	13333,91296	13420,53816	13194,18124	0,08576917	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5SD51	20,17306352	24,18099838	5,801338632	0,57807672	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE100487	52,69422356	32,223424192	0,340919548	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
REVERSE73559	20856,21962	24243,42531	21940,95968	0,077402342	2	3	1	0	0	0	1	1	0	2
A0A077RU09;A0A096UK77;A0C	176114,8164	202670,5959	19749,9338	0,073511887	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
A0A1D5XQU5;A0A1D5XQU4;	1334277,154	1512851,748	1438350,172	0,062789559	7	3	1	0	0	0	0	7	0	0
REVERSE9448	2367483,253	2594190,803	2496603,338	0,045741933	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6DKU4	8130,89485	8895,735086	7673,332591	0,080614993	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE9622	1276,341536	1463,463382	13863,52541	0,0442828										

AOA1D5WNW5;W5CH01;W5C	30001,85891	21434,69612	31632,96142	0,197840064	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5UZ7;AOA1D5VQ2;	97107,78424	105521,0472	102890,2451	0,042261449	5	3	1	0	0	0	0	5	0	0
REVERSE41108	23715,30331	15843,44992	23101,74248	0,209627653	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
REVERSE15487	7170,505183	7108,776621	7126,89257	0,004446813	4	3	1	0	0	1	1	0	4	0
AOA1D5Z7V1;AOA1D5Z7V5;AOA1D5Z7V6;AO	0,063824201				2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AOA1D6BHK5	1308,443347	851,3501609	440,716595	0,500752472	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5RRB1	655,1550594	540,790947	249,964014	0,433432753	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5YQ4	29039,39777	23448,59897	30576,4725	0,135478045	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5XLR6;AOA1D5XLR7;AO	140437,1419	105666,3024	139712,734	0,154496917	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
P10385	4214,881412	3428,968621	2149,128911	0,319413964	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0
W5DX22;W5E7W6;W5EGQ0	4192,510059	2912,303704	4037,159287	0,188103088	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Q00M56	1864,588844	2011,776249	1709,683864	0,081128517	9	3	1	0	0	0	0	9	0	0
AOA1D5BUF1;POCZ07;POCZ08	218172,7137	201808,514	212016,2532	0,039233978	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA1D5YNN8;W5F9B5	48946,46017	58615,27231	52062,68514	0,092751454	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
REVERSE68711	23325,63516	20474,71631	24313,37569	0,087791414	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
REVERSE63042	28335,7979	252908,8314	299457,2426	0,0848618	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
AOA1D5YTB6;W5F6H2	44369,85902	59875,49221	42446,76154	0,195426306	4	3	1	0	0	0	0	4	0	0
AOA1D5SW91	16029,02157	15282,69243	17316,6247	0,063475324	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5CA16	45466,39407	51751,39712	49948,22683	0,065971216	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE58143	35761,70756	39477,2633	42205,87301	0,082625706	2	3	1	0	0	0	1	1	0	2
AOA1D6CFU7;P16851	121226,3319	116872,0062	122901,8597	0,025865802	5	3	1	0	0	0	0	5	0	0
AOA1D6C3W7	2153,659524	1510,287101	2067,38441	0,182798374	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5YI4;AOA1D5YIWS	1421,530332	1621,929731	1176,282396	0,158682292	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5STM3;W5AFW9	2955,141995	3954,286326	3694,869236	0,146673517	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA0C4BIW4;AOA0C4BK54;AO	44620,72399	52305,74533	45975,2422	0,086119876	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE32946	2418,988136	1728,036249	1214,849664	0,338082661	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0
AOA1D5SSU51;AOA1D5SSU50	9322,565723	9909,9052979	9637,15659	0,030523995	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA1D6CV87;AOA1D6CV88;AO	4615,143791	4518,496789	3761,624873	0,108734005	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5RY09;AOA1D5ZF15	20377,291	204067,1512	189453,8154	0,041439655	13	3	1	0	0	0	0	0	13	0
W5DRY6;AOA1D5X5Z2	226475,136	224087,4657	226049,7402	0,005646988	5	3	1	0	0	0	0	5	0	0
AOA1D6CDM8;AOA1D6DKF8	420,8798145	449,2937227	507,1917709	0,095807591	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA077RTS1	842,4345622	1345,906841	1198,025153	0,229253274	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5WX7	306,3205678	645,0776746	342,0066393	0,431737228	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
M9T6G0	64810,97077	60123,03712	65344,89326	0,045298863	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
REVERSE61547	5441,05453	5313,079125	6054,33459	0,070718228	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
AOA1D5CC2;AOA1D5CC3;AO	124650,4433	119092,3125	124459,1842	0,025707845	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
AOA1D5WRM1	1189,845104	2208,18282	1683,206782	0,3006656	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE40091	12694,98008	14081,83487	14532,13455	0,06953974	2	3	1	0	0	1	1	0	2	0
AOA1D6S855;R9W6A6;AOA1D5	135051,659	115026,6027	128028,4602	0,080616088	6	3	1	0	0	0	0	6	0	0
AOA1D6C8D6	36291,97721	39339,51051	34991,24751	0,060525804	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA0D6UY8;AOA0D8UYX3;AO	3452,06669	35484,9885	35786,21758	0,018676114	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE24363	3590,353965	4712,83137	4247,420063	0,134804433	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
AOA1D6CLY9;AOA1D6BRX3;AO	224845,0713	214723,5153	206753,6981	0,042085761	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
P82901;AOA1D5XXC5;AOA1D5	110713,0551	126417,1647	108299,5495	0,085439522	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA1D5YS68	15304,81564	16836,83123	15427,57789	0,053687252	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
REVERSE48646					1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AOA1D5ZBG9;AOA1D5ZBH1;AO	51804,4042	51409,49845	53154,87932	0,017559498	4	3	1	0	0	0	0	4	0	0
AOA1D5WBU6	24385,65461	21672,89367	23841,3285	0,061593381	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
AOA1D5Z990	27375,6782	28119,41066	28382,59091	0,018677871	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D6D917	13427,5182	13392,86225	13432,75617	0,001615736	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D6C207;Q51TK5	85068,20832	67319,99994	7075,28436	0,116210322	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE65742	53414,7832	55811,45804	53430,95758	0,025435249	3	3	1	0	0	0	1	1	0	3
AOA1D5XXD3;AOA1D5XD4;AO	10845,28432	7845,144786	15096,1706	0,323511495	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE59562	1632,41027	1877,807348	1626,032274	0,083849111	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0
AOA1D5XMK2	17027,97641	18120,22802	17777,00644	0,031660647	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
AOA1D6B7D4	4453,006571	4956,84785	4412,245448	0,065839136	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE99407	56928,82392	71923,14546	60620,63715	0,123697762	3	3	1	0	0	0	1	1	0	3
AOA1D5RV86;AOA1D5S939;W4ZRV5	31,71310416				1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5WV323	17285,15915	22489,62242	16818,62014	0,166881509	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA1D5SNP0					1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D6DIE4;AOA1D6DIE5;AO	38649,44592	34932,20045	31309,82251	0,104963175	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA1D6D5H8	11416,03004	13117,8233	11244,963	0,086821128	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA1D6AG97;AOA1D6BE1X;AO	25673,09506	25910,68945	27308,09961	0,03359307	4	3	1	0	0	0	0	4	0	0
AOA1D5URA1;AOA1D5RRC9;AO	3671,244411	4220,663816	4282,38209	0,082906399	4	3	1	0	0	0	0	4	0	0
J7HT09	7992,250699	5891,009421	4435,626602	0,292822209	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
AOA1D5UP09;AOA1D5UP0;AO	459,8448061	1069,56005	842,9989756	0,389719759	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5S15;AOA1D5S16;AO	165661,1666	199217,6552	196733,5442	0,009880521	4	3	1	0	0	0	0	4	0	0
AOA1D5TS27	14545,16673	17954,35469	15998,19785	0,105285284	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
AOA096UKU5	28289,01763	26052,60572	28552,01591	0,049705473	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5V6V1	7113,974488	8285,12918	7346,494576	0,08177945	2	3	1	0	0	0	0	2	0	0
AOA1D5XPB2;AOA1D5XPB3	301,8624933	120,2301449	306,2201021	0,437226112	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D5VFC5;AOA1D5VU68;AO	21410,45032	23410,71951	21921,33282	0,046713447	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA1D5VP13;P01084	11805,56563	13517,26413	12501,60596	0,068273982	6	3	1	0	0	0	0	6	0	0
AOA1D5TSR5;AOA1D5TSR6	225208,4946	211859,1642	230655,164	0,043450315	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
AOA1D6CN55;AOA1D6CN56;AO	53604,92480	56625,32397	54654,75284	0,027899649	3	3	1	0	0	0	0	3	0	0
AOA1D64Q02	79946,31584	94864,06503	83187,51514	0,091236777	1	3								

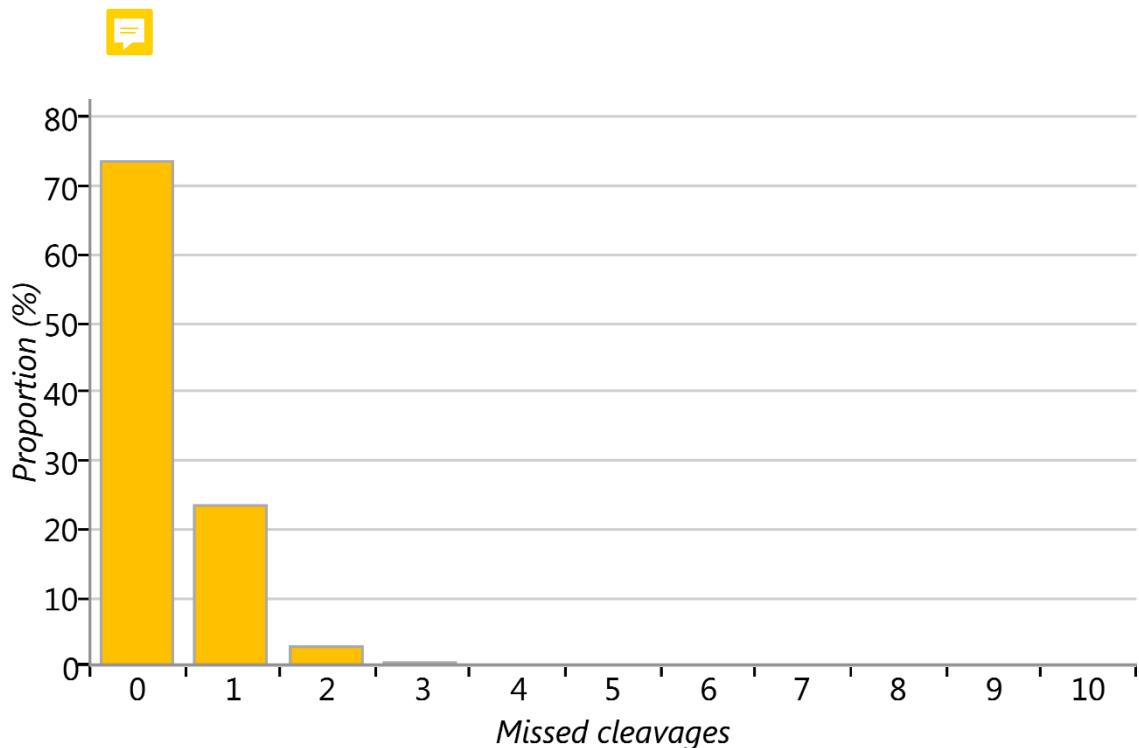
Accession	14_R001	14_R002	14_R003	14_CV	Ave_Peptides	Replication Count	Rev Count [SEARCH("REV",A2)]	Rev Count 2/3	Pept/Protein 2/3	Pept/Protein 2/3 Reverse
A0A1D6RWI1	173311,4462	166008,0508	162860,7405	0,0320283	2	3	0	0	2	0
A0A1D6ARV8					1	3	0	0	0	0
A0A1DSUOC0	2055,064365	2001,032758	2303,758013	0,0761608	1	3	0	0	0	0
P33432	1467406,281	1510231,156	1504619,39	0,0155779	4	3	1	0	0	0
A0A1D5YDS6;A0A1D5Z2L2;	152286,1727	143138,5485	153804,2147	0,0385310	1	3	0	0	0	0
A0A1D5VDY9;A0A1D5WPAl	795,5183132	763,6460542	515,1461792	0,2220039	6	3	1	0	0	0
064393	75801,28993	69360,39641	71399,67051	0,0456017	1	3	0	0	0	0
A0A1D5V8K8	47862,17165	47879,71733	44494,81681	0,0416987	1	3	0	0	0	0
REVERSE29260	175607,8703	170133,7331	179753,9174	0,0275474	2	3	1	0	0	1
A0A1DXAR2;A0A1DXAR1	284539,5354	304299,5963	297511,9413	0,0339822	8	3	1	0	0	0
REVERSE10072	275,3685189	417,5240912	301,7365609	0,2280848	1	3	0	0	0	1
REVERSE74392	57760,12517	65174,68321	63861,50182	0,0635437	1	3	0	0	0	1
A0A1D5VF84	2994,285684	3483,243557	4005,546423	0,1447253	2	3	1	0	0	0
A0A1D5WMBO	16451,05946	18611,68212	16874,07407	0,0661396	1	3	0	0	0	0
A0A1DXCE6;A0A1DXCE7	61968,10228	62641,20087	66618,51962	0,0394281	1	3	0	0	0	0
A0A1D5YJ7	95737,7448	98106,21091	103877,5253	0,0421880	2	3	1	0	0	0
B2Y2Q6	1432313,551	1337493,977	1380175,477	0,0343290	10	3	1	0	0	0
A0A1D5V8W1;A0A1D5V8W	753004,5217	721740,2449	782946,7344	0,0406685	11	3	1	0	0	0
M9TGF7;P08453	2578546,704	2550995,426	2489784,387	0,0178883	3	3	1	0	0	0
A0A1D5VA75;A0A1D5WCT:	46577,02429	49556,1307	48131,56565	0,0309852	1	3	0	0	0	0
W5D616	301680,6315	291252,8753	298547,6747	0,0180055	2	3	1	0	0	0
A0A1D5XF06;A0A1D5XF07;	194,5110576	114,4774332	162,9398799	0,2562643	3	3	1	0	0	0
A0A1D5WUQ0;A0A07RPL1	5992,194594	2855,757671	2907,823473	0,4583231	3	3	0	0	0	0
A0A1D5YE0;A0A1D5YEH1	251147,2783	263075,7824	260281,9709	0,0241657	12	3	1	0	0	0
A0A1D5SZ45	40409,8607	41721,10231	38958,26035	0,0342396	2	3	1	0	0	0
A0A1D5SQM9;A0A1D5SQN	142700,1234	135864,0937	139430,7657	0,0245392	2	3	1	0	0	0
A0A1D5UEA5	20450,59412	21051,83874	20841,44525	0,0146816	1	3	0	0	0	0
A0A1D6CC32;A0A1D6CC33;	173,4785164	439,8824625	99,70623684	0,7528639	1	3	0	0	0	0
A0A1D6B080;A0A1D6B082;	18330,37563	19750,35192	13440,27096	0,1927516	2	3	1	0	0	0
A0A1D5XG64;16QQ39;A0A1	283427,1424	283683,178	296766,2816	0,0264917	25	3	1	0	0	0
W5DV70	315123,7504	314242,5292	298832,7529	0,0296116	1	3	0	0	0	0
A0A1D6BMD2	547994,9611	554186,0046	564290,3561	0,0148079	2	3	1	0	0	0
P04724;P18573	1017099,113	1025696,069	1050188,378	0,0166530	3	3	1	0	0	0
A0A1D5URU3	24468,3122	18509,62028	19547,95663	0,1527272	2	3	1	0	0	0
A0A1D6RZK9	12654,5055	12324,84496	13178,70877	0,0338547	1	3	0	0	0	0
P17314	829085,1432	848566,5007	799827,8091	0,0297062	4	3	1	0	0	0
A0A1D5SA86	668595,4721	624295,1009	638673,1087	0,0351013	2	3	1	0	0	0
A0A1D5ZH4;A0A1D6A3QC	1172,649934	1107,697971	1288,951331	0,0771840	1	3	0	0	0	0
A0A1D5UE55	133456,5523	139472,1618	131841,9329	0,0298027	1	3	0	0	0	0
REVERSE1E0101	234516,0279	214237,954	74547,39096	0,4993088	1	3	0	0	0	1
A0A1D6A389;A0A1D6A391;	53380,07584	68640,33649	83078,3975	0,2172278	3	3	1	0	0	0
A0A1D6C415	48893,14395	65923,43031	75853,56973	0,2145351	1	3	0	0	0	0
REVERSE57083	497515,3964	504044,9521	507028,0273	0,0097681	2	3	1	0	0	1
A0A1D5SHP6;A0A1D5SUL7	39708,40626	49527,93634	44148,3109	0,1102346	1	3	0	0	0	0
A0A1D5Z7G1	1904,492074	3227,539196	2735,955293	0,2549928	2	3	1	0	0	0
A0A1D5WAY0	1900,956271	1390,951208	861,920972	0,3752298	2	3	0	0	0	0
A0A1D5TRCS5;T1VZ18;T1VZ	171167,9958	176178,2882	180297,5384	0,0261278	1	3	0	0	0	0
A0A1D6BQM7;W5HPC1;A0	154631,7954	143197,0231	139948,7848	0,0528522	5	3	1	0	0	0
A0A1D5S346;A0A1D5WZY9	3371146,267	3160155,357	314443,287	0,0392513	4	3	1	0	0	0
A0A1D5VPD8	13567,32776	16628,46195	15252,36013	0,1012030	1	3	0	0	0	0
A0A1D5YFA6;A0A1D5YFA7	196630,605	183970,4634	181945,2336	0,0424427	14	3	1	0	0	0
A0A1D6C286;A0A1D6C287	132357,9574	107533,1277	107533,9525	0,1237595	2	3	1	0	0	0
A0A1D5WJ12	170996,4784	149734,0754	176068,4472	0,0843726	1	3	0	0	0	0
REVERSE124618	194454,3052	250865,335	257150,6217	0,1474510	3	3	1	0	0	1
A0A1D6RUM0;A0A1D6RUN	5875,095314	5670,355747	5168,913202	0,0652129	1	3	0	0	0	0
A0A1D6RT9;A0A1D6RT50	76875,37114	90477,45937	87174,93342	0,0836213	3	3	1	0	0	0
A0A1D5SVW4;P08488	141638,7873	148062,5792	133063,0787	0,0534415	13	3	1	0	0	0
A0A1D5VVQ2;A0A1D6RSZ6	444414,0886	514543,9691	509599,1336	0,0801264	1	3	0	0	0	0
A0A1D6S9D0	1025691,974	973196,2499	1048976,66	0,0382076	1	3	0	0	0	0
A0A1D5SJN8;W4ZXB7;A0A1	143082,0734	143011,3966	144765,3148	0,0069131	2	3	1	0	0	0
REVERSE114344	189618,595	1708745,792	1734318,031	0,0571078	1	3	0	0	0	1
A0A1D5VCN0;A0A1D5WIE9	281405,8372	251680,9653	295685,1357	0,0812624	3	3	1	0	0	0
A0A1D6RJ99	11812,3434	8885,941599	9856,981715	0,1463449	1	3	0	0	0	0
A0A1D5ZD7	601052,2235	594145,9575	675672,1706	0,0724918	1	3	0	0	0	0
A0A1D5SS61;P16315	4645,069913	6151,424321	6800,617541	0,1885219	1	3	0	0	0	0
REVERSE32775	117527,8495	157233,8498	143972,6203	0,1448256	2	3	1	0	0	1
A0A1D5VSM8	320101,4766	394049,725	421888,4907	0,1389177	1	3	0	0	0	0
A0A1D6COB3	433035,6361	401201,4565	370202,4522	0,0782543	1	3	0	0	0	0
A0A1D6D575;P83207	639975,3658	582058,7853	543343,4077	0,0826445	4	3	1	0	0	0
Q0Q5D9	313637,6513	286380,4201	288995,8029	0,0507493	11	3	1	0	0	0
REVERSE8438	132423,2399	169016,6787	160097,8506	0,1240267	2	3	1	0	0	1
A0A1D5UQB7;A0A1D5UQB8	17348,27494	11288,39739	12331,0841	0,2372521	3	3	1	0	0	0
A0A1D5YCI4	134382,0213	137273,447	131932,8036	0,0198720	2	3	1	0	0	0
A0A1D5WR93	13212,33051	16494,60804	17400,35567	0,1403305	4	3	1	0	0	0
A0A1D6A6D2	15742,85437	21638,15413	25544,80117	0,2352523	1	3	0	0	0	0
A0A1D5S7P5;A0A1D5S7P6;	177804,3564	155674,0893	162046,3459	0,0689694	6	3	1	0	0	0
A0A1D5SRZP4	118148,3741	117677,2569	117787,102	0,0020912	2	3	1	0	0	0
A0A1D5X5C6;A0A1D5Z536;	88011,18876	95168,12086	96326,26452	0,0483400	3	3	1	0	0	0
P81713	726580,0835	66029,8421	714687,3949	0,0505033	4	3	1	0	0	0
A0A1D5SRL7	4450,663464	4708,660457	4877,701389	0,0459622	1	3	0	0	0	0
A0A1D6B419	161640,4733	131998,7311	145735,3904	0,1012854	4	3	1	0	0	0

REVERSE23485	6232,090689	4407,259408	10282,53233	0,4311858	2	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5T117	564255,3744	487466,2681	522689,5719	0,0732430	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5T2J1	47548,99331	75496,26497	80231,86467	0,2606568	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5RZF1;W5C1U0;W5E	272729,6152	293341,3911	304923,8398	0,0561661	3	3	1	0	0	0	0	3	0
P93693;W5FZG2;A0A1D5ZB	1230336,629	1115871,819	1113407,038	0,0579335	9	3	1	0	0	0	0	9	0
A0A1D5XTT2	237551,831	305037,8064	319455,4787	0,1521618	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5ZLD8	118838,6356	112346,5179	100231,2028	0,0854900	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D6AQAL4	188230,7294	177685,5749	164626,112	0,0668633	5	3	1	0	0	0	0	5	0
W5AKY9;A0A1D5T267;A0A:	1137586,275	944468,8854	883168,8834	0,1343354	19	3	1	0	0	0	0	19	0
A0A1D5ZL98;A0A1D5ZDW1	80665,57487	82690,04539	79618,13208	0,0192816	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D5YZP8;A0A1D5ZTP1;	33080,12681	43098,79474	48484,42605	0,1881244	1	3	0	0	0	0	0	0	0
B2BZD1	44285,86431	47592,7665	48341,65214	0,0461736	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D6APP4	105332,5713	84951,65528	77267,80708	0,1626209	1	3	0	0	0	0	0	0	0
D2KFH1	147269,4198	147745,0095	157085,7512	0,0367304	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5Y681;A0A1D5Y683;	176760,981	172475,4598	167202,2139	0,0278129	13	3	1	0	0	0	0	13	0
A0A1D5ZS29;A0A1D5X611;	33140,87491	28654,34389	27908,68667	0,09465520	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5RVEO	74082,2578	59525,30932	59613,89429	0,1300943	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5SWU55;A0A1D5WU5	172986,1928	172801,3259	171562,8707	0,0044878	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5TR14;A0A1D5UA11;	27122,38366	35679,54943	34879,98054	0,1451631	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5TOL2	4984,209365	12564,62889	14105,23066	0,4627309	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5X8Y9;A0A1D5X8Z0;	134372,1066	127025,8951	119538,3973	0,0584111	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6DAN1	46434,59344	43679,02347	42083,78961	0,0488732	1	3	0	0	0	0	0	0	0
O6SPZ3;I0IT51	222861,7004	264189,069	272439,8197	0,1049300	5	3	1	0	0	0	0	5	0
P10387	2253915,582	2372838,203	2380947,979	0,0304451	15	3	1	0	0	0	0	15	0
B1GX6	106308,8295	108520,1364	102115,9793	0,0307887	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5YYK0;A0A1D5ZG58;	77007,8035	71028,50776	69651,95947	0,0538922	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5W9D9;A0A1D5W9E	278103,0675	247086,1043	229275,4082	0,0982539	6	3	1	0	0	0	0	6	0
W5ACP2;W4ZT34;W5A5S8	50589,18749	63329,09626	59869,70139	0,1137226	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5S2A7;A0A1D5S2A6;	309388,6831	272927,5304	312719,2356	0,0739922	6	3	1	0	0	0	0	6	0
A0A1D6BR39	59926,35937	69678,50256	127155,8968	0,4244634	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5SDD4;A0A1D5SD5	74333,27691	103639,0406	281357,3761	0,7316835	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5UE03	11081,92247	8399,336107	8599,266899	0,1596577	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6B1M3	40449,60892	31229,1262	30686,6236	0,1607994	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5V7H4	67213,75273	91195,46173	84553,40211	0,1528893	4	3	1	0	0	0	0	4	0
REVERSE57600	62,66792853	817,6078843	136,8680493	1,2272668	1	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE47178	9864,851916	14102,22943	14030,30505	0,1915359	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5WW18;P01085;W5I	9723,170581	11250,01108	9437,466024	0,0961365	7	3	1	0	0	0	0	7	0
A0A1D5UW10	75254,25767	135255,5117	136944,6874	0,3034024	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5ZWY2;A0A1D5ZWY	3924,749416	3486,372218	3035,5487	0,1276813	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WD68;A0A1D5WD6	29674,76716	30376,34167	34727,95569	0,0866489	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6BM26;A0A1D6CQB-	206191,4734	20082,44951	5190,261835	1,4515883	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WVG4	47358,5225	46698,96578	49752,17687	0,03351548	1	3	0	0	0	0	0	0	0
P02861	700134,3527	601946,7792	601769,7964	0,0894079	3	3	1	0	0	0	0	3	0
W5GKK6	37693,54277	44152,22695	37299,0949	0,0568866	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6BF91	82726,63073	75070,53175	72367,03926	0,0700389	2	3	1	0	0	0	0	2	0
Q9492;A0A1D6REQ9	174805,5572	178111,1176	189207,1887	0,0417460	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5WDT5;A0A1D5W85	70677,8607	67205,84415	67550,89706	0,0279324	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5X4W1	2675,181345	5302,951848	8372,95259	0,5232211	3	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE90489	73945,28276	57412,38022	48645,052	0,2141169	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6CHE0;A0A1D6CHE2	3684,36176	3116,073767	2713,973018	0,1537333	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5V617	40327,41209	34795,69518	36768,50126	0,0751665	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D6AZF2	160352,0427	160836,9921	188611,2812	0,0951979	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6BPP8;A0A1D6CRM1	68674,07624	77269,53433	82776,21253	0,0932218	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE45014	1551,051808	334,8331874	1116,582408	0,6158110	2	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6B50	946,2602451	2107,67348	1712,410132	0,3716648	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5VX2;W5DIU6;A0A1	173058,9411	166851,9824	156531,7739	0,0504497	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D6B2E2	7241,356955	14547,84319	13050,82076	0,3323356	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5ZD7;A0A1D5ZDY2	9820,335158	10336,08673	12707,44382	0,1405559	4	3	1	0	0	0	0	4	0
REVERSE111614	7376,764027	6302,109117	6221,622551	0,0972252	2	3	1	0	0	1	1	0	2
P04726	7451,41834	9643,719411	11777,4813	0,2247559	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE92699	320,2298651	194,7382418	550,3040293	0,5078367	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5WSA0	501,6758711	3023,640072	3427,30066	0,6841233	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE82133	41854,37839	46063,95655	42683,25289	0,0512239	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6BRM9;A0A1D6BRN1	38335,56788	27119,15463	66290,32966	0,4593606	5	3	0	0	0	0	0	0	0
W5B8A7	2673,52023	303,7343204	2813,851943	0,7306651	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE843	20835,28696	32547,71349	83456,19124	0,7298835	2	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A0C4B86;A0A1D5XE80;	17442,67116	16920,68654	16015,13916	0,0430126	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6D361;A0A1D6D362	151378,5759	24562,69726	26915,96911	0,10728835	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE25348	133835,626	120915,7425	120908,0573	0,0595874	3	3	1	0	0	1	1	0	3
A0A1D5VPL6;A0A1D5VPL9;	87281,61873	112555,1628	102261,5001	0,1262070	3	3	1	0	0	0	0	3	0
REVERSE68704	2740,832599	3148,101576	6591,218879	0,5084740	1	3	0	0	0	1	0	0	0
P06659	211890,1672	210219,9439	351409,5283	0,3142958	5	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6C4E8;A0A1D6C4E9;	75896,84622	102918,134	143844,2862	0,3180757	5	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE14418	122859,2229	149918,2696	268957,0569	0,4304227	4	3	0	0	0	1	0	0	0
W5E1I9	81099,07379	74155,86833	63729,63011	0,1197719	2	3	1	0	0	0	0	2	0
W5H3A0	161605,5334	161562,1146	562959,9778	0,7845415	1	3	0	0	0	0	0	0	0
P04729;Q8W3V5	61130,78244	78167,93795	75378,42099	0,1277017	5	3	1	0	0	0	0	5	0
P81496;Q43691;Q43723	26616,96061	34619,11155	31710,85103	0,1307364	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CV02	15065,45184	21536,52934	22080,61374	0,1995124	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CE1;Q2A784;A0A	96639,49052	1											

REVERSE65571	30597,84489	36914,27482	33053,58112	0,0949872	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5S2W3	33619,25245	39552,69439	36603,5973	0,0810765	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE22959	262615,0104	258106,5692	300680,9346	0,0854188	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5RXN1	59752,73416	55759,20591	59289,33624	0,0374863	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WEM4	15710,60448	17597,51534	23081,54572	0,2037056	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6ABM2;A0A1D6ATH'	96586,80766	93016,40072	86433,50896	0,0559773	7	3	1	0	0	0	0	7	0
A0A1D6AYX4	162311,651	211363,2561	231239,1279	0,1759487	8	3	1	0	0	0	0	8	0
A0A1D5ZGR0;A0A1D5ZGR2	23949,18181	33434,25142	80137,83284	0,6561602	1	3	0	0	0	0	0	0	0
POCZ05;Q2A783	11837,1042	16750,14501	10020,01779	0,2705493	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5YB6;A0A1D6D1U6	230861,2603	272433,015	281353,2867	0,1030329	6	3	1	0	0	0	0	6	0
A0A1D5RYQ8;A0A1D5S806,	4667,443848	6251,418184	6169,9373	0,1565793	12	3	1	0	0	0	0	12	0
W5GFR6	98718,82829	124964,6057	127038,1484	0,1350274	2	3	1	0	0	0	0	2	0
W5AK13	10709,01794	8056,690244	13851,09466	0,2667934	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE43385	98228,25198	117780,6409	73367,07674	0,2307683	2	3	1	0	0	1	1	0	2
A0A1D5SEV5;A0A1D5SEV6	7889,741825	12271,24906	11878,50763	0,2269938	1	3	0	0	0	0	0	0	0
B2Y2Q1	15961,70419	31576,12998	29054,48391	0,3283262	9	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5VPJ2	34028,66696	37387,95394	34778,80223	0,0498126	4	3	1	0	0	0	0	4	0
REVERSE80371	5519,262505	3608,864506	7209,331715	0,3307779	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5Z6N0	880,9217432	985,7115551	7042,558215	1,1878389	2	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE6163	78616,29542	107892,9273	120849,5422	0,2111778	1	3	0	0	0	1	0	0	0
W5CDA6;W5CU29;W5DP84	96182,80256	86228,99108	85072,67979	0,0685056	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE109229	182472,0939	155474,8568	143965,4766	0,1230448	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5XVS4;A0A1D5XVS8;	35286,97631	77007,6204	73069,2284	0,3728047	8	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5YP21;A0A1D5YWy7	21461,83728	19890,07485	20101,04933	0,0416466	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W5DN88	425093,0202	535447,4005	437859,0995	0,1295044	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CB53	8991,170953	2716,492544	6080,467106	0,5295778	5	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5X466	7949,715144	14631,13483	65747,29058	0,10738708	1	3	0	0	0	0	0	0	0
Q8W3V4	341692,3311	434398,3303	454226,7385	0,1464782	5	3	1	0	0	0	0	5	0
W5BBJ5	86029,76194	107958,7148	106843,7938	0,1231725	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5ZIQ1;A0A1D5ZIQ2	108,7414224				2	1	0	0	1	0	0	0	0
A0A077RTB0;A0A1D5VU95	311,9595818	4368,554839	1875,473824	0,9362302	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE40639	39474,81093	34807,49935	30213,32238	0,1329470	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6BV11;A0A1D6D1B0	99575,79764	217011,1549	182936,2818	0,3628467	5	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE45973			3021,775291		2	1	0	0	1	1	0	0	0
A0A1D6S585	11390,28384	12915,48181	9359,449671	0,1589769	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6DD13	79585,63342	54389,25615	56925,72939	0,2180141	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5TK48	66233,20554	56867,95971	51543,9699	0,1277452	5	3	1	0	0	0	0	5	0
REVERSE60851	112423,011	135537,477	134696,7993	0,1036381	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5VV16	1197,277714	595,1260406	2501,885464	0,6809323	1	3	0	0	0	0	0	0	0
P24296;Q8GZB0	55674,98475	150023,1722	145711,9051	0,4547766	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6DIS2;A0A1D6RXD5;	920461,6962	828293,6208	800433,9571	0,0739289	12	3	1	0	0	0	0	12	0
A0A1D5T37;A0A1D6RE0R0;	53069,35273	245037,2846	126911,618	0,6838471	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5SE57;W4ZQ59	80764,38984	64545,33658	64499,90818	0,1340818	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE98744	6517,646544	11255,46065	18089,79846	0,4866568	2	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5VZ0;A0A1D5WHX8	117720,7837	153541,2728	158144,5145	0,1546075	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6DLY4	571,7574091	874,2294045	4732,651189	1,1264190	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5XF01;A0A1D5Z019;	3031,767184	3173,313928	22658,48941	1,1735403	4	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WMB8;A0A1D5RU2	34818,58994	31519,36858	41911,09601	0,1471839	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5ZGT7	563474,0409	387887,6293	405051,4946	0,2141219	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D6CC40	181244,3005	305309,9361	305154,5363	0,2712532	3	3	1	0	0	0	0	3	0
P30569;P30570	91065,19724	96023,79173	92715,34749	0,0270734	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5Y2R0;A0A1D6RWFE	1162682,36	1317889,015	1431714,882	0,1035550	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE82464	4373,78919	18755,84437	15840,43501	0,5852898	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5TIF8	15551,24887	7511,937706	5490,372142	0,5591538	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5YWP4	452,140862	1849,737348	6802,296681	1,0995411	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE12788	8716,467066	6230,166337	6391,940067	0,1955782	5	3	1	0	0	1	1	0	5
A0A1D5YV02	76151,60426	100660,085	93796,69063	0,1401655	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5WL94	1104535,139	917234,6856	916153,9624	0,1107428	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5SC67;A0A1D5SC68;	60707,97042	119965,4902	125334,3595	0,3515872	6	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6A2L5;A0A1D6A2L6;	160440,6846	135798,7692	133455,1496	0,1043734	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5SA31	11093,85175	9883,344373	11930,82874	0,0938438	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W5BKT0	99509,57091	99961,8176	98116,16028	0,0096979	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W5CQ52	888,9569037	5927,806047	1,0453655	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CY11;A0A1D6BX05;	733,3890785	2465,3363	2329,245683	0,5226481	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5UFU8	3460,057298	3125,596608	2990,75264	0,0756936	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5ZZ18			7154,932102		1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6DG9	106947,9503	175924,6985	196776,4146	0,2940507	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6REH6;A0A1D6REH5	43834,66162	37029,11072	33045,59781	0,1436852	7	3	1	0	0	0	0	7	0
W5D952	2229,283456	2014,742665	2157,286955	0,0511707	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE4464	25243,31929	15621,42933	13578,59926	0,3432500	2	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5WMH8	50975,85461	46543,23914	44603,29222	0,0689516	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6C2R0	82,70999311	433,1120444	3,692861187	1,3198216	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6BN82	79047,78355	66176,42297	87332,54024	0,1375226	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WIN9	1039358,141	1385169,706	1337591,764	0,1494654	2	3	1	0	0	0	0	2	0
W5I5X1;W5HSW8;A0A1D6C	523382,1234	439168,324	419860,6018	0,1194601	3	3	1	0	0	0	0	3	0
REVERSE55378	254264,2439	25114,6761	253868,8354	0,0067109	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5VR46;A0A1D6AUB3	1491,410681	5321,337628	4360,922858	0,5350135	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6D7F3	34929,09913	31497,73977	132,6765747	0,8643128	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W5FRP9			2180,954908		1	1	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE100305	34878,68485	1493,140404	2200,080596	1,4835424	3	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6CY36	23434,9845	19848,35545	19411,5727	0,1056382	2	3	1	0	0	0	0	2	0

A0A1D5XYE1	2,572240069	358,1459472	170,1818866	1,0051831	1	3	0	0	0	0	0	0	0
P12299;A0A1D55CN8;A0A1	601156,042	498374,1769	492262,8399	0,1153071	8	3	1	0	0	0	0	0	8
A0A1D6CAE0	22292,72413	25171,38444	38013,21081	0,2937592	2	3	1	0	0	0	0	0	2
A0A1D5WSZ8	995,2492479	6861,528942	8152,810138	0,7148267	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5SDD1	210,2955206	826,3960705	11,88199753	1,2151693	2	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE100487	3678,313205	1861,102339	63,54858398	0,9677331	1	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE73559	25799,73226	19577,87387	19195,49752	0,1722470	2	3	1	0	0	1	1	0	2
A0A1D6B071	89756,62718	363087,6269	349947,068	0,5760692	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CM14;A0A1D6C4W	47550,10797	22047,35246	37589,55759	0,3597295	4	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE39966	1361,870868	7690,582394	6191,177839	0,6508565	1	3	0	0	0	1	0	0	0
W4ZWQ1;W5AKV2;A0A1D5	42380,24804	35915,73838	39370,97268	0,0824739	2	3	1	0	0	0	0	2	0
W5FN32;A0A1DSYUG2;W5I	24600,71162	22398,68221	18625,39271	0,1381442	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D5XHK8	141587,6243	86058,04567	80450,52932	0,3290720	3	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE73022	4815,944377	73,51139145	48,13153076	1,6680621	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6SCD3;A0A1D6SCD4	8923,592181	39199,8651	35347,19637	0,5923331	4	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE68779	5560,696435	7515,791302	2,0114422	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D6BUY8;A0A1D6DDJ	3467,694861	3074,913245	2523,726461	0,1569082	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A077RU09;A0A096U7K7;	226454,9635	213828,196	183232,1144	0,1069352	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5XQU5;A0A1D5XQU	232057,2592	1056118,684	1113145,214	0,6159851	7	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE9448	2737006,983	2475937,43	2489243,544	0,0572713	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6DKU4	6211,043283	2714,537548	5990,399049	0,3938308	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE9622	1308,120068	1033,045318	808,8207524	0,2381733	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5SW23;A0A1D5SW2	1387,005581	2721,125395	1755,024123	0,3525615	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CDY5;A0A1D6CF2	735,947678	1260,183245	1017,587715	0,2611657	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE31755	9,751184598	675,352026	2562,320824	1,2232065	1	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE9847	9260,282366	2459,261128	2724,138387	0,8001535	2	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE106807	4,270139117	441,8883571	571,5768655	0,8762269	2	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE79905	35212,93608	33438,31111	35714,17266	0,0343744	3	3	1	0	0	1	1	0	3
A0A1D5S923	16264,61153	95397,42129	93514,57349	0,6602161	10	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE77889	26132,97778	200279,1916	189731,1065	0,7038989	2	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE20796	5900,618354	19114,39977	20726,72675	0,5335038	2	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6C183;A0A1D6CJ9;A	135723,1472	92616,74274	88468,68392	0,2477893	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6D384;A54A4L4;DOEV	175868,8811	212772,3428	194939,7004	0,0948722	5	3	1	0	0	0	0	5	0
W5GXSO	3796,838405	724,3733531	13889,89977	1,1223139	1	3	0	0	0	0	0	0	0
W5FFQ7	505,4797037	105,016124	9276739	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE121344	7558,936499	300,1022759	134,5853882	1,5910724	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5XG59;A0A1D5XG60	38897,33641	37156,18214	31991,42191	0,0997255	9	3	1	0	0	0	0	9	0
W5ECA4;A0A1DSX07;A0A1	564043,9596	560807,1045	557396,2399	0,0059282	29	3	1	0	0	0	0	0	29
A0A1D5XJ4;A0A1D5XJ5;V	400,5132355	503,9109468	0,1616791	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6S714;A0A1D6S715	732,3449263	18278,46613	19841,5052	0,8192785	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WNW5;W5CH01;W	19316,79893	27152,14401	23988,98714	0,1678371	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5UZW7;A0A1DV1Q	101806,2093	89343,03332	75817,00031	0,1460660	5	3	1	0	0	0	0	5	0
REVERSE41108	13629,97007	20427,60096	12945,05152	0,2640193	1	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE15487	4267,365928	7898,939643	6365,906881	0,2951257	4	3	1	0	0	1	1	0	4
A0A1D5Z7V1;A0A1D5Z7V5;	1,785054924	0,071494591	403,7947941	1,7201718	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6BH5X	1178,723497	2432,559442	573,6240303	0,6796900	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5RRB1	18637,54561	1196,799705	462,4086778	1,5206335	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5YQ14	11932,98628	14001,424354	0,1127927	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5XLR6;A0A1DSXR7;	1947,565487	70672,65259	96305,6775	0,8665506	3	3	0	0	0	0	0	0	0
P10385	927,6176142	2685,115285	3375,458601	0,5418117	4	3	0	0	0	0	0	0	0
W5DXZ2;W5E7W6;W5EGQ1	27709,33693	5317,996558	3552,75279	1,1043865	1	3	0	0	0	0	0	0	0
Q00M56	980,154486	447,394235	3229,219345	0,9512094	9	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6BUF1;P0C207;P0CZ1	192566,6094	336160,3056	285466,6126	0,2683268	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D5YNM8;W5F9B5	44036,67986	55750,44072	56566,97827	0,1345130	2	3	1	0	0	0	0	2	0
REVERSE68711	10762,48221	22252,33882	22288,90377	0,3604234	1	3	0	0	0	1	0	0	0
REVERSE63042	5102,004821	195344,9484	188281,988	0,8323724	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5YT86;W5F6H2	19349,20213	88322,24449	95792,99113	0,6213974	4	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5ZW91	22906,47191	16368,81428	16171,56013	0,2073732	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CAJ6	62234,11713	51947,48782	39677,22961	0,2201947	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE58143	734562,082	51683,9706	37725,91454	1,4503540	2	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6CFU7;P16851	124491,3562	122721,8533	127167,7652	0,0179362	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D6C3W7	154,0305716	1883,21814	1,2003642	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5YIW4;A0A1D5YIW5	2999,720759	1646,255967	1594,027869	0,3831383	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5STM3;W5AFW9	11748,39531	4453,55115	3774,36476	0,6639074	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A0C4BIW4;A0A0C4BK54	6748,82046	46179,6311	43949,65167	0,6859052	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE32946	670,8703873	4542,370308	3541,111699	0,6886399	1	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D5S51;A0A1D5S50	9779,698948	8573,504626	7731,926634	0,1183757	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D6CV87;A0A1D6CV88	717,3124223	9794,489939	12832,56558	0,8100665	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5RYQ9;A0A1D5ZF15	24852,11484	190544,4112	167957,4184	0,7031731	13	3	0	0	0	0	0	0	0
W5DRY6;A0A1D5S52	24893,44797	235746,2147	215215,752	0,0728301	5	3	1	0	0	0	0	5	0
A0A1D6CDM8;A0A1D6DFK8	25,26457465	361,7782179	397,7819882	0,7854101	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A077RTS1	15,06255622	850,9235996	770,9916446	0,8452985	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WXF7	1062,596979	272,6714135	334,3422127	0,7894254	1	3	0	0	0	0	0	0	0
M9T60	19873,81792	91604,61978	73613,70237	0,6048974	3	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE61547	3198,845725	2973,79993	0,0515602	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1D5TC2;A0A1D5TC3;	131922,3063	123259,4471	121789,946	0,0435728	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5WRM1	1081,099886	1341,538223	16406,88816	1,3979320	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE40091	47039,6645	4455,922664	7402,042995	1,2113015	2	3	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D6S8R5;R9W6A6;A0A	123631,5517	11283,2856	115313,3725	0,0480620	6	3	1	0	0	0	0	6	0
A0A1D6C8D6	43083,22126	30880,63557	37944,48371	0,1642384	3	3							

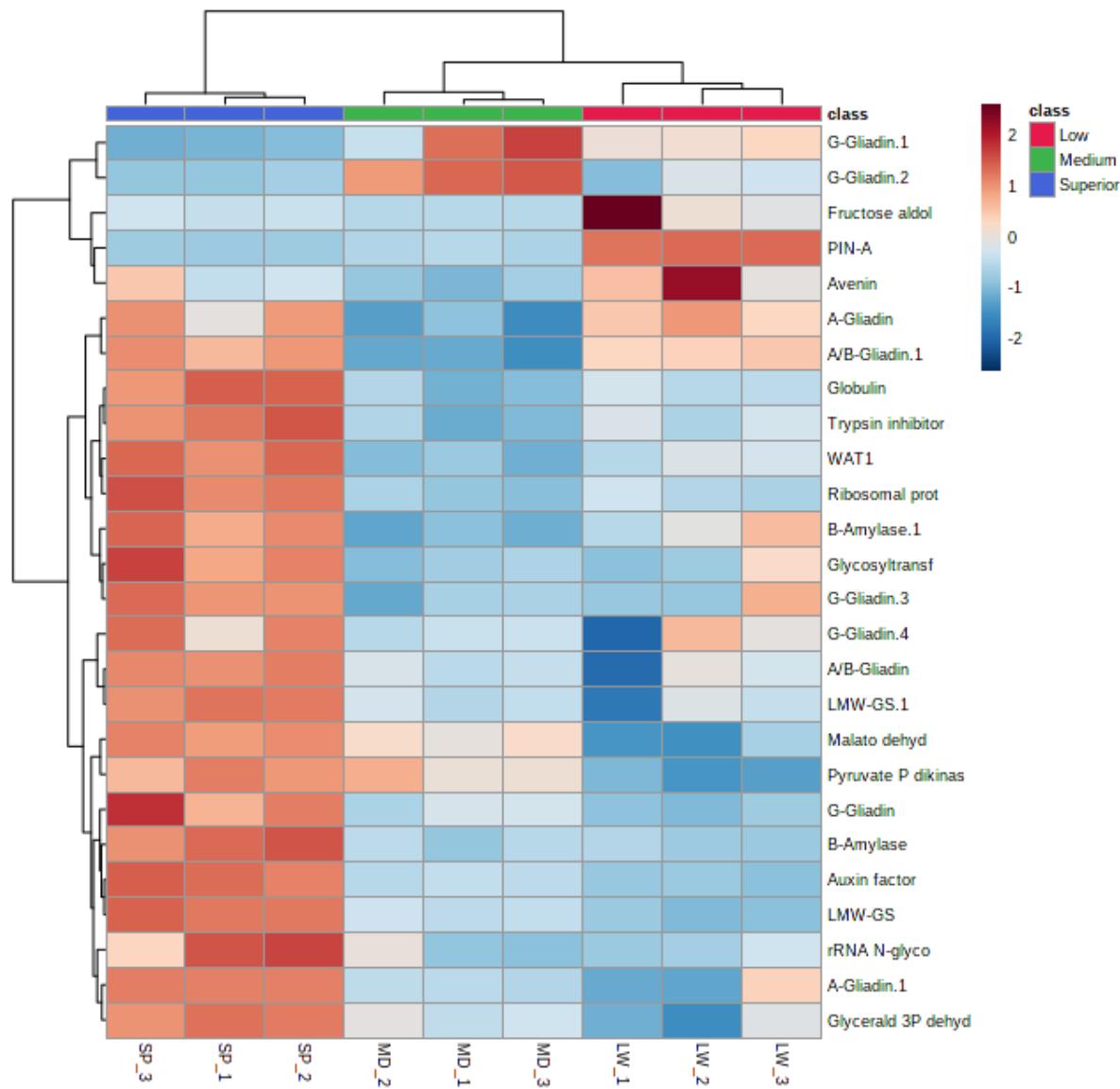
A0A1D5XMK2	22122,94167	20182,46721	15614,38934	0,1730759	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6B7D4	4436,127257	5050,940281	4967,957672	0,0692350	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE99407	63634,31273	56754,77185	54494,80743	0,0816603	3	3	1	0	0	1	1	0	3
A0A1D5RV86;A0A1D5S939;	6728,355572				1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5W323	6399,331822	26769,28694	28036,13956	0,5951910	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5SNPO	8674,742572				1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6DIE4;A0A1D6DIE5;A0A1D6DIE6	41987,04128	22098,10671	29078,25134	0,3249344	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6D5H8	2916,68041	18388,92908	15989,59069	0,6698299	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6AGT9;A0A1D6BEX1	17114,73788	29483,45058	30165,19895	0,2870820	4	3	1	0	0	0	0	4	0
A0A1D5URA1;A0A1D5RRC9	2539,595255	10842,4288	2787,597528	0,8763988	4	3	0	0	0	0	0	0	0
J7HT09	5347,420907	7236,426605	8429,357841	0,2218625	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D5UPS9;A0A1D5UPT0	28198,7689	594,8440485	239,4779896	1,6574918	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5SD15;A0A1D5SD16,	239205,0151	155494,9374	135368,9449	0,3116605	4	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5TS27	21738,30639	13767,47741	14035,82855	0,2741019	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A096UKU5	39727,09215	29950,10993	23856,89833	0,2567845	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5V6V1	3601,604983	9476,235561	7346,46273	0,4368454	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5XPB2;A0A1D5XPB3	2173,683971	19,51047094	268,3241009	1,4362735	2	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5VFC5;A0A1D5VU68	9845,040824	25673,84478	25437,33948	0,4464480	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5VPJ3;P01084	11869,43547	13448,46146	12771,95153	0,0623949	6	3	1	0	0	0	0	6	0
A0A1D5TSR5;A0A1D5TSR6	226220,6474	226336,5879	226142,3889	0,0004319	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6CNS5;A0A1D6CNS6	44802,47199	55348,95175	61624,50143	0,1576421	3	3	1	0	0	0	0	3	0
A0A1D6S4Q2	93394,52413	86699,92457	78723,38587	0,0851359	1	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D6A2T8;A0A1D5ZWJ6	231967,4629	83425,63996	79393,76656	0,6607206	5	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5WG42;A0A1D5WG4	18997,28139	17736,34953	25335,13527	0,1968266	2	3	1	0	0	0	0	2	0
A0A1D6AID0	1012,534928	3105,134699	3736,593736	0,5446133	1	3	0	0	0	0	0	0	0
REVERSE111267	2617,086568	3747,696736	4723,611513	0,2852195	1	3	0	0	0	1	0	0	0
W4ZUK2;W5AB71;A0A1D51	4665,243247	3674,016865	2508,418245	0,2985671	2	3	1	0	0	0	0	2	0



Supplementary data S2 - Percentage of missed cleavages



Supplementary data S3



s3. Heat map illustrating the clustering of differentially abundant and annotated proteins that were found in low (LW), medium (MD) and superior (SP) samples. The horizontal axis presents replicates from each sample and the vertical axis presents the proteins. Color gradient represents the variation of protein abundance. Highest quantities are represented by dark red and lowest quantities by dark blue.



Accession	Prosite	InterPro	PIRn	Predominant domain
ADA1D5V06	RICH_3_LECTIN_Lectin domain of ricin B chain	Rice B-like lectins (IPR038992)	No	Ricin domain of ricin B chain
ADA1D5V84	PPR_Pentatricopeptide (PPR) repeat protease	Pentatricopeptide repeat (IPR028885)	No+M3:M24R repeat	PPR domain
ADA1D6A89	G_DYNAMIN_2_Dynamin-type guanine nucleotide-binding (G) domain	Dynamin-type guanine nucleotide-binding (G) domain (IPR030381)	Dynamin family	Dynamin family
	UBIQUITIN_2_Ubiquitin domain	Ubiquitin domain (IPR006262)	Ubiquitin family	Ubiquitin family
ADA1D6C286	H15 Linker histone H1/H5 globular (H15) domain	GTPase effector domain (IPR020850)	Dynamin GTPase effector domain	don't apply
ADA1D6R911	NO	Linker histone H1/H5, domain H15 (IPR005818)	linker histone H1 and H5 family	Histone H1/H5
ADA1D6V17	PROTEIN KINASE_DOM Protein kinase domain	NO	NO	NO
ADA066U01		Protein kinase domain (IPR000719)	Protein kinase domain	Protein kinase domain
ADA1D5Z71	MATH/TRAFF domain	Glycoside hydrolase, family 19, catalytic (IPR000726)	Chitinase class I	don't apply
	BTB domain	Plant calmodulin-binding domain	Plant calmodulin-binding domain	Plant calmodulin-binding domain
ADA1D5W44	no	MATH/TRAFF domain	MATH domain	MATH/TRAFF domain
ADA1D5XK82	Adenosine and AMP deaminase	BTB/POZ domain	BTB/POZ domain	BTB/POZ domain
ADA1D5V605	B3 DNA-binding domain	no	no	no
ADA1D5V606	Peptidase family A1 domain	cupin 1	Cupin 1	Cupin 1 (play a role in allergy, especially seed storage proteins like 7S and 11S globulins)
	Serine/Asp type domain	B3 DNA binding domain	B3 DNA binding domain	B3 DNA binding domain
ADA1D6D75	Cerel trypsin/alpha-amylase inhibitors family	Peptidase family A1 domain	Eukaryotic aspartyl protease	Peptidase family A1
ADA1D6W005	YTH domain (RNA binding)	Sapsin B type, region 2	Sapsin B type	Sapsin B type
ADA1D5T499	Ankyrin repeat repeat circular (protein-protein interaction)	beta-barrel inhibitor/plant lipid transfer protein/seed storage helical domain	beta-barrel inhibitor/seed storage/LTP 1, beta-barrel inhibitor/seed storage/LTP family	beta-barrel inhibitor/seed storage/LTP family
	Ankyrin repeat	YTH domain	YTH domain (RNA-binding)	YTH domain (RNA-binding)
ADA1D7F211		Ankyrin repeat-containing domain	YTS19-B-like domain	YTH domain (RNA-binding)
ADA1D5V902		PGG domain (Its function is not known)	Ankyrin repeats	Ankyrin repeats (protein-protein interaction)
ADA1D5XK44	Carbamoyl-phosphate synthase subdomain	Amino acid transporter	PGG (Domain of unknown function)	PGG (Domain of unknown function)
ADA1D5W498	Zinc finger C2H2 type domain	Zinc finger C2H2 type domain	Amino acid transporter	Amino acid transporter
ADA1D5V604	Small hydrophilic plant seed proteins	cupin 1	cupin 1 (play a role in allergy, especially cupin 1)	cupin 1 (play a role in allergy, especially cupin 1)
ADA1D5U087	Heat shock hsp70 proteins family	cupin 1	cupin 1 (play a role in allergy, especially cupin 1)	cupin 1 (play a role in allergy, especially cupin 1)
ADA1D5V608	No	cupin 1	No	No
ADA1D5V609	No	No	No	No
ADA1D5W491	Serine proteases, subtilase family, serine active	No	No	No
ADA1D5V913	Serine proteases, subtilase family, serine active	No	No	No
ADA1D6B792	Cerel trypsin/alpha-amylase inhibitors family	Peptidase S8/S53 domain (serine peptidase)	Peptidase inhibitor I9	Peptidase inhibitor I9
WSFA02	Cytochrome P450 cytochrome heme-iron ligand	No	Peptidase inhibitor I9	Serine protease/Peptidase inhibitor I9
ADA1D5X509	Carbamoyl-phosphate synthase	No	Sapsin B family	Sapsin B family
ADA1D5T117	No	No	No	No
WSFA01	Zinc finger C2H2 type	Zinc finger C2H2-type	No	No
ADA1D5V906	No	Zinc finger RING-type	No	No
ADA1D5R294	AAA-protein family	Zinc finger C2H2-type	No	No
ADA1D5Z245		AAA-ATPase domain (cellular processes: membrane fusion, proteolysis an AAA proteins	NB-ARC domain (a novel signalling motif found in bacteria and eukaryotes, shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals)	NB-ARC domain (a novel signalling motif found in bacteria and eukaryotes, shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals)
ADA1D5V901	Proteinase trypsin/alpha-amylase inhibitors	Peptidase M41	Peptidase family M41	Peptidase family M41
ADA1D5W001	No	No	No	No
ADA1D5V904	Translation elongation factor (are responsible for two main processes during elongation factor	Bifunctional inhibitor/plant lipid transfer protein/seed storage helical domain	Protease inhibitor/seed storage/LTP I, Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Protease inhibitor/seed storage/LTP I, Protease inhibitor/seed storage/LTP family
ADA1D5V905	OTU domain (None of these proteins has a known biochemical function but low sequence similarity)	Peptidase S8 domain (serine peptidase)	Cytochrome P450	Cytochrome P450
ADA1D6L014		Cupin 1	Cupin 1 (play a role in allergy, especially Cupin 1)	Cupin 1 (play a role in allergy, especially Cupin 1)
ADA1D5Z260		Bifunctional inhibitor/plant lipid transfer protein/seed storage helical domain	Protein of unknown function	Protein of unknown function
ADA1D5V916	Fibronectin type-III domain	GCK (involved in intracellular signalling pathways)	Zinc finger, C3HC4 type	Zinc finger, C3HC4 type
	Oboron, PHD finger (Is found in a wide variety of proteins involved in the regulation of chromatin structure)	GCK domain (intracellular signalling p GCK domain (intracellular signalling pathways)	Peptidase CG5 Ortabain (is a highly specific ubiquitin iso-peptidase)	Peptidase CG5 Ortabain (is a highly specific ubiquitin iso-peptidase)
ADA1D5S004	No	No	No	No
ADA1D5U003	No	No	No	No
ADA1D5V923	No	Cupin 1	Histidine phosphotase superfamily	Histidine phosphotase superfamily
WSFA06	Lipoyletic enzymes	Cupin 1	Cupin 1 (play a role in allergy, especially Cupin 1)	Cupin 1 (play a role in allergy, especially Cupin 1)
ADA1D5E657	No	GDSL lipase/esterase	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase	Lipoprotease enzymes
ADA1D5V568	F-box domain	No	Lipase, esterase abundant protein	lipase, esterase abundant protein
ADA1D5V183	Small heat shock protein	F-box domain	FBD (its precise function is unknown, F-box domain mediates protein-protein interactions, is associated with cellular functions such as signal transduction and regulation of the cell cycle)	FBD (its precise function is unknown, F-box domain mediates protein-protein interactions, is associated with cellular functions such as signal transduction and regulation of the cell cycle)
ADA1D6S400	No	Alpha crystallin/Hsp20 domain	Hsp20/alpha crystallin family	Hsp20 domain
ADA1D5V914	ERCC4 domain	Sucrose synthase	Sucrose synthase	Sucrose synthase
ADA1D5T177	No	ERCC4 domain	ERCC4 domain (a family of nucleases ERCC4 domain (is a family of nucleases)	ERCC4 domain (a family of nucleases ERCC4 domain (is a family of nucleases)
ADA1D6M495	No	Tfc3, extended winged-helix domain (play a role in linking tauA, tauB, and T	Tfc3, extended winged-helix domain (play a role in linking tauA, tauB, and T	Tfc3, extended winged-helix domain (play a role in linking tauA, tauB, and T
ADA1D6B419	No	B-block binding subunit of TFIIIC (prot B-block binding subunit)	B-block binding subunit of TFIIIC (prot B-block binding subunit)	B-block binding subunit of TFIIIC (prot B-block binding subunit)
ADA1D5XLR6	NO	No	No	No
ADA1D5V956	Protein kinase domain	Protein kinase domain	Protein kinase domain	Protein kinase domain
ADA1D5WU00	Zinc finger C2H2 type domain	Zinc finger C2H2-type	No	Zinc finger C2H2 type domain



Victorio et al. Supplementary Table S1. List of identified and quantified proteins of the whole wheat flour (WWF) group, based on TOP3 quantification.

ACCESSION	DESCRIPTION (OMICSBOX)	REPORTED PEPTIDES	SEQUENCE COVERAGE	A1 1	A1 2	A1 3	C1 1	C1 2	C1 3	AVE A1	AVE C1
P17314	alpha-amylase tetrameric inhibitor subunit CM3	13	75,60	1857308	1220311	1141631	1089508	1150698	1122086	1406417	1120764
P01085	dimeric alpha-amylase inhibitor	15	94,35	1343154	1340291	1297130	1158692	1032345	1128455	1326858	1106497
AOA3B6UR20	alpha-amylase tetrameric inhibitor subunit CM3	11	78,57	850502	609935	605259	534609	555459	526883	688565	538984
Q4U1A4	dimeric alpha-amylase inhibitor	14	95,04	407532	431568	451508	738257	745532	676160	430203	719983
P01084	Alpha-amylase inhibitor 0.53	15	95,97	451759	381845	380520	258357	244512	255730	404708	252866
J7HW03	alpha-gliadin	5	30,29	781428	336899	528266	600530	488227	593681	548864	560813
X2KY9	monomeric alpha-amylase inhibitor	13	88,74	938107	942493	831802	637967	727329	743467	904134	702921
AOA1K0JNG6	alpha-gliadin	5	45,78	41775	32120	88361	190932	132390	192772	54085	172031
W5D003	dimeric alpha-amylase inhibitor	15	68,83	885993	861347	931814	668424	659112	705602	893052	677713
AOA3B6SH4	beta-amylase, a-1,4-glucan maltohydrolase	38	79,05	579095	556640	491644	481299	492642	846575	542459	606839
P01083	monomeric alpha-amylase inhibitor	12	79,74	13439	13502	11916	11949	13623	13925	12952	13166
AOA3B6R7A6	ALP	4	55,43	560729	482361	416363	488924	610580	684978	486484	594827
AOA3B6U9P0	beta-amylase, a-1,4-glucan maltohydrolase	34	78,94	1247150	987498	930228	918955	938743	980308	1054959	946002
AOA3B6EW7	histone H2B.3	8	43,71	787186	568145	583155	620724	625990	636731	646162	627815
AOA3B6UD25	CSB_alpha gliadin 15	4	35,29	462033	471342	492185	264792	235782	324968	475187	275181
Q2A784	ALP	6	47,02	604601	447772	540875	622214	631046	661501	531083	638253
P10388	high molecular weight glutenin subunit 1Dx	12	18,28	272220	573653	582599	545425	557842	651636	476157	584967
AOA3B6LFC8	alpha-amylase/trypsin inhibitor-like	14	83,11	273505	406857	372219	285651	317937	303978	350860	302522
AOA3B6NQQ5	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	21	77,15	424779	352394	352137	335961	320564	325793	376437	327439
A5A4L4	avenin-like protein	11	56,34	413342	408077	426285	499413	459164	482686	415901	480421
A0A3B6YD4	beta-amylase, a-1,4-glucan maltohydrolase	30	70,53	993449	751570	865351	901234	930690	890927	870124	907617
AOA1K0R00	alpha-gliadin	3	16,55	62844	64712	53102	98765	73743	94019	60219	88843
Q2A783	Avenin-like b1	12	55,44	363960	307556	400501	601757	605417	652735	357339	619970
AOA3B5ZP43	11S globulins	25	58,58	784253	694796	667400	774411	774228	786049	715483	778229
P04730	low-molecular-weight glutenin subunit	8	29,92	628601	1261764	1333129	1642460	1511733	1405853	1074498	1520015
P16159	avena alpha amylase trypsin inhibitor-2	9	65,03	684575	787332	699834	648174	707087	858281	723914	737847
D6QZM8	Avenin-like b10	10	55,28	167430	145239	164196	307720	304861	305714	158955	306099
P93693	RecName: Full=Serpin-Z1B; AltName: Full=TriaeZ1b; AltNa	19	75,94	563766	418065	400225	474359	483521	473155	460685	477012
AOA3B6T7D9	basic endochitinase C	13	76,32	350149	422655	326784	334571	358275	327114	366530	339987
Q4ZBL8	class II chitinase	10	75,19	537725	443387	543062	469516	467840	437529	508058	458295
P24296	Non-specific lipid-transfer protein 1	4	32,74	523555	349794	296784	126435	131782	1711404	390044	143207
AOA3B6GLT2	16.9 kDa class I heat shock protein 1-like	8	65,56	346358	247361	290514	196401	201359	184965	294744	194242
I6QQ39	63 kDa globulin-like protein	33	66,16	1158501	830617	769392	793671	781131	778264	919503	784355
AOA3B6SNK2	alpha-amylase/trypsin inhibitor-like	12	86,22	143333	108140	153189	129306	133256	131285	134888	131282
AOA3B5VYZ7	gliadin-like avenin	8	43,35	880116	794419	916516	825773	608548	621483	863684	685268
AOA3B6LV31	protein synthesis inhibitor II-like	14	70,55	648521	591622	626630	452478	588387	453611	622258	498159
AOA3B6SU01	class II chitinase	9	68,42	259153	212036	237132	9673	10175	9746	236107	9865
AOA3B6JOP1	avena alpha amylase trypsin inhibitor-2	7	65,03	499646	350091	317200	284774	272219	292235	388979	283076
AOA3B6RKE1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic	19	81,98	584130	306935	391165	246895	279563	248216	427410	258225
D2KF9	gliadin-like avenin	6	42,79	846783	619434	1027629	730403	802184	676993	831282	736527
Q41593	Serpin-Z1A	11	44,47	20636	16759	18830	9408	9833	9940	18742	9727
AOA3B6B3H4	histone H4	8	58,25	467900	437525	500413	544937	562941	565159	468613	557679
P10387	HMW glutenin subunit	18	39,35	1245943	1246192	1128024	1045256	1070209	1074257	1206720	1063241
AOA3B5YTY7	glucose and ribitol dehydrogenase homolog	23	74,14	276060	198083	235031	272058	304936	302130	236391	293041
AOA3B6FTZ6	avena alpha amylase trypsin inhibitor-2	6	53,10	562443	537295	490199	400698	401717	418035	529979	406817
Q84Q15	grain softness protein-1	8	40,24	424284	501333	441042	449054	445833	417576	455553	437487
Q8S4P7	alpha-amylase/trypsin inhibitor-like	13	79,56	159845	106983	126990	153240	158627	155715	131273	155861
AOA3B5ZRA1	glucose and ribitol dehydrogenase homolog	21	72,05	194518	140838	160506	110803	122897	165287	119278	
AOA3B6RP58	basis endochitinase A	10	49,53	0	0	0	71905	75489	70523	0	72639
AOA3B6ILV9	63 kDa globulin-like protein	39	64,16	399935	325794	317128	260310	261880	271976	347619	264722
AOA3B6U76	63 kDa globulin-like protein	37	69,81	288902	252267	205877	172260	186315	156665	249015	171746
P32032	Alpha-purothionin	6	45,59	370156	317165	210528	146537	173691	150275	299283	156834
AOA3B6T7X8	farin protein	12	48,93	656076	507426	560833	594458	531271	687365	574778	604365
P01544	beta purothionin	6	49,21	509147	381902	226070	262459	295292	261577	372373	273109
AOA3B6MYZ0	Globulin-1 S allele	25	66,26	559521	445547	614546	382535	477692	406778	539871	422335
B6UKM9	Gamma gliadin-A3	3	17,54	12845	352683	449796	670413	643869	671950	271775	662077
AOA3B6KNF4	Globulin-1 S allele	28	64,00	915816	763729	766099	718108	858291	784233	815205	768677
AOA3B5XV32	11S globulin	24	56,08	449736	361072	327191	456026	463694	472732	379333	464151
P16851	avena alpha amylase trypsin inhibitor	6	53,10	679798	460972	413320	303939	290466	330898	518030	308435
P06659	gamma-gliadin	4	36,08	494265	451596	461218	609513	559439	576693	468897	581882
Q9ST58	Serpin-Z1C	16	62,06	196361	181304	178420	324236	348197	328456	185362	333630
A0A341YEF9	Histone H2B.2	4	54,55	25444	17404	18969	27519	29089	28976	20606	28528
AOA3B6UV8	Globulin-1 S allele	22	51,68	557923	476721	444714	604595	550900	484858	493119	546784
AOA3B6KQL2	SERPIN domain-containing protein	14	47,99	184894	181709	220993	366322	353127	390113	195865	369854
Q03033	Elongation factor 1-alpha	21	60,63	689706	503181	601969	498977	526835	488843	598285	504885
AOA3B6JER7	63 kDa globulin-like protein	34	63,32	1024912	879836	806446	668299	682516	679237	903731	676684
AOA3B6PJQ3	phosphoglycerate kinase, cytosolic	24	76,80	114346	100968	129067	37549	41480	37805	114794	38945
AOA3B6E2Z5	phosphoglycerate kinase, cytosolic	24	71,82	163998	144811	185112	220216	243269	221719	164640	228402
AOA3B5XVL2	glucosidase and ribitol dehydrogenase homolog	21	72,05	256714	168503	172714	135358	158027	146241	199310	146536
Q94G92	Gamma gliadin-D4	5	39,60	515770	328671	359979	83396	62094	46999	401473	64163
D2KFH1	Avenin-like a4	5	59,30	56977	36369	414848	327470	278844	403886	44944	336733
Q10464	purothionine b	6	33,11	574817	332978	280478	298073	302632	304631	396090	301779
P16347	alpha-amylase inhibitor	13	83,89	546272	443420	543948	388670	433595	446548	511213	422938
A3KLL4	malate dehydrogenase, cytoplasmic	17	63,96	330305	257086	312671	274367	276352	266710	300020	272476
AOA3B6KPY9	protein synthesis inhibitor II-like	15	72,56	200014	146454	153711	155760	163123	147037	166756	155307
Q5BHT9	grain softness protein	8	48,78	205892	184915	218747	147754	145861	140345	203185	144653
P33432	Purothionine-A	5	37,16	18540	13912	13577	514190	554265	547874	15343	538776
AOA3B6MXN3	endosperm transfer cell specific PR60 precursor	7	53,27	398344	227379	219981	136556	150048	150350	281901	145651
AOA3B6KBC7	enolase	23	73,32	189347	193206	197289	195787	209579	191103	193281	198823
Q9X3Q7	protein disulfide isomerase	33	66,99	96602	136873	125757	135966	135496	113131	119744	128197
AOA3B6ITU0	trypsin/alpha-amylase inhibitor	6	46,53</								

A0A3B6PKU0	tubulin beta chain	14	51,80	77529	50115	51342	50452	48549	50266	59662	49756
A0A3B6MU6	purple acid phosphatase 3	7	24,18	51716	32365	35430	39345	38797	39698	39837	39280
A0A3B6ELY8	peroxiredoxin-2C	3	30,86	72536	60594	55352	47388	46425	41026	62827	44946
A0A3B6EM13	triosephosphate isomerase, cytosolic-like	9	49,22	23821	22188	29584	20305	26451	23112	25198	23289
P49234	profilin	3	43,51	72718	59276	77619	55922	54246	51479	69871	53882
A0A3B6PNJ4	limit dextrinase inhibitor	5	42,21	21373	19803	16924	9694	8473	6525	19367	8231
D9ZLW0	outer envelope pore protein 16-2, chloroplastic-like	5	39,31	104938	86748	73482	44332	57519	49936	88389	50596
A0A3B6FQD3	oil body-associated protein 2B	5	42,00	34398	46264	41906	31990	38715	33178	40856	34628
A0A3B6PI06	calnexin homolog	13	27,95	27942	23896	21144	21001	21030	19451	24327	20494
A0A3B6ELC9	60S ribosomal protein L24	3	24,84	87248	45174	60664	44653	49239	48144	64362	47345
A0A3B5YW2	cell division control protein 48 homolog E-like	15	25,87	3589	2568	3185	0	0	0	3114	0
Q41630	ADP-ATP carrier protein, mitochondrial	9	38,37	10384	8805	6116	10263	9952	8749	8435	9655
A0A3B5Y2X5	Chitinase 2	5	37,02	29932	25319	30622	53999	59352	60012	28624	57788
A0A3B5Y0N0	cell division control protein 48 homolog E-like	12	26,63	8806	5334	7175	0	0	0	7105	0
A0A3B6N288	Late embryogenesis abundant protein Lea14-A	5	28,83	38856	23231	25496	27947	28458	29675	29195	28693
A0A3B5Z1T0	chaperone protein ClpB1	22	39,48	77656	72301	73157	70289	75594	70140	74371	72008
A0A3B6B045	calnexin homolog	13	31,51	9049	10488	9532	10593	11023	9964	9690	10527
A1Y-E31	ribosomal protein L3	8	23,91	64627	72198	61355	60578	67149	65968	66060	64565
A0A3B6I180	alcohol dehydrogenase-like 2	13	50,00	53781	36855	55753	51188	53272	51535	48796	51998
A0A3B5ZWW3	Chitinase 2	7	45,67	22056	24917	19679	12575	13062	13262	22217	12966
A0A3B6PGD2	calnexin homolog	8	17,55	63322	54384	48579	50103	54036	48110	55428	50749
A0A3B6JCE1	ribonuclease TUDOR 1	31	43,72	48206	37526	44556	71106	72318	81412	43429	74945
W5AS4	40S ribosomal protein S15	3	34,42	26650	15722	19305	12824	13715	14013	20559	13517
A0A1D5US94	acetylserotonin O-methyltransferase 3-like	5	21,71	22947	19151	23297	15857	17984	16567	21798	16803
A0A3B6ECX9	Translocon-associated protein subunit beta	3	17,62	12233	23033	30505	27934	31950	25208	21924	28364
A0A3B6IX62	late embryogenesis abundant protein D-34-like	7	43,75	41470	36939	38994	31797	29657	25822	39134	29092
A0A3B6LL76	phosphoenolpyruvate carboxylase 2	34	49,90	103209	71242	66806	75263	85470	73657	80419	78130
W5EB84	ribonuclease TUDOR 1	31	44,59	38169	29713	35279	0	0	0	34387	0
A0A3B5ZYU5	thioredoxin H-type	4	65,87	12346	10142	18515	11762	12815	13014	13668	12530
W5H631	60S ribosomal protein L27-3	4	31,39	12029	18241	50212	23234	35381	37797	26827	32137
P80602	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic	7	41,43	44899	36892	38853	40237	36306	39856	40215	38800
A0A3B6TN4Z	60S acidic ribosomal protein P3	3	49,17	29975	29021	39856	13644	11853	15868	32951	13788
A0A3B6CFZ3	Calreticulin	12	41,84	33177	53922	62482	96700	87616	87051	49860	90455
A0A3B6CM04	xylene isomerase	15	45,30	15377	21663	20785	22185	24618	23348	19275	23383
A0A3B6JD8	alpha-amylase/trypsin inhibitor	4	28,76	5097	4533	2555	9715	15329	13673	4062	12906
W5AUH7	40S ribosomal protein S10-1	4	23,40	39885	38780	39468	52638	55915	52767	39378	53773
A0A3B6LHJ2	heat shock cognate 70 kDa protein 2-like	8	14,67	118290	88623	106759	53179	41191	54204	104557	49525
A0A3B6HW60	phosphoglucomutase, cytoplasmic	20	40,18	39240	34233	31030	38945	41607	38658	34834	39737
A0A3B6DIK2Q	probable nucleoredoxin 1-2	11	27,90	41774	46637	69606	56507	62152	60346	52672	59668
Q6RU9J	glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-3	5	26,80	44813	36650	36719	18262	21135	19904	39394	19767
A0A3B6KSZ6	SERPIN domain-containing protein	2	4,33	51002	45210	47190	81768	71725	76536	47801	76676
A0A3B6SID4	60S ribosomal protein L7a-2	6	19,77	77355	61644	77536	62873	75010	71840	72178	69908
A0A3B6RK3	BAG family molecular chaperone regulator 7	7	17,83	29340	22651	29636	33371	34520	37354	27209	35081
A0A3B6R06	universal stress protein PHOS34	2	18,07	83183	55394	50750	42377	50129	45019	63109	45842
W5C8N6	40S ribosomal protein S6	5	32,40	89371	48922	57016	66672	63239	60649	65103	63520
A0A3B6SQW0	predicted protein	2	34,09	41422	27844	11779	23156	32607	31320	27015	29028
A0A3B6PTJ6	dehydron 4	2	14,85	100087	36184	37809	38552	33456	37842	58026	36616
A0A1D5UX7T	cysteine proteinase inhibitor 8	3	32,52	38003	25462	32169	12353	29226	33129	25732	33243
A0A3B6NT53	ADP-ATP carrier protein, mitochondrial	9	27,11	75474	72195	61710	71331	67644	59772	69793	66249
A0A3B6ASQ9	xylene isomerase	14	39,79	32403	78213	47949	49498	47048	54981	52855	50509
A0A3B5Y4C0	chaperone protein ClpB1	20	36,49	19491	17153	18916	15560	17697	16189	18520	16482
A0A0775G40	40S ribosomal protein S2-3-like	10	39,93	112215	58145	57505	69086	69814	66606	75955	68502
A0A3B6TJ01	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-2, mitochondrial	5	22,40	10014	19841	20297	18787	19370	20873	16717	19676
A0A1D5ZL7T	actin-depolymerizing factor 3	4	41,30	18044	24309	34842	32687	33822	32157	25732	33243
A0A3B6RMCS	Chitinase 1	4	14,98	34957	18801	42933	16193	15004	15945	32350	15714
A0A3B6QDC6	predicted protein	6	29,24	48730	31531	45333	34900	35259	32066	41865	34075
A0A3B6QE0	limit dextrinase inhibitor	5	28,76	20824	16445	13333	14264	18503	14606	16867	15791
A0A1D5UPJ6	pyruvate kinase, cytosolic isozyme	10	30,93	45973	48451	47736	48891	50585	48608	47386	49361
A0A3B6TBU2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1	8	24,43	29287	24369	29380	38378	43038	42174	27679	41197
W5CWR9	probable aldo-keto reductase 1	6	22,29	51029	52941	55322	44826	47422	45086	53097	45778
A0A3B6EQ45	predicted protein	10	33,87	19394	17924	23103	24679	29737	25507	20140	26641
A0A1D6CBE4	reticulon-like protein B2	8	30,00	44524	43839	40658	34621	42502	32016	43007	36380
A0A3B5YY70	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like 5	5	36,10	72665	67074	55842	57511	62058	48791	65194	56120
W5D322	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mu	13	45,96	60519	97316	91004	110357	92420	92445	82946	98407
A0A3B6PS22	oleosin 16 kDa-like	2	13,17	0	0	40115	40288	40325	0	40243	
A0A3B6MU19	hypothetical protein CFC21_078234	4	52,17	7903	10679	10463	23942	36599	29249	9681	29930
A0A3B6IOX9	prohibitin-1, mitochondrial-like	5	29,48	38475	26839	28437	28243	29227	30856	31250	29442
I0IT63	alpha-gliadin	3	34,49	39985	9530	16689	16938	6273	17092	22068	13434
A0A3B6N282	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like 5	5	24,55	1960	25006	22964	16092	21922	13694	16643	17236
A0A2XOTY93	glutaredoxin 4H6	5	57,36	17495	13606	20859	18909	19067	15545	17320	17840
D8L983	protein disulfide isomerase-like 2-1	10	45,50	64188	44705	60227	40408	46868	39949	56373	42408
A0A3B6NKJ0	histone H2A-like	3	25,16	3833	43733	34489	33832	53028	37161	27232	41341
A0A2X0SL3	40S ribosomal protein S6-2	5	28,40	15805	17333	18299	17705	18411	17618	17146	17911
A0A3B6LFH5	pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase	11	28,46	18283	14755	15478	18385	19932	21995	16172	20104
W5D048	Tubulin beta chain	11	40,49	39752	20022	24775	29652	62040	43790	28183	45161
A0A3B6PS43	alcohol dehydrogenase class-3	9	34,65	64919	67637	66045	46540	59709	51449	66200	52566
A0A3B6DB4	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1A-like	3	21,91	18364	16130	21952	19584	26135	18052	18815	21257
W5FV77	40S ribosomal protein S23	4	40,14	68309	2836	53629	50854	47904	57931	41591	52230
A0A3B6HPE1	embryonic protein DC-8 isoform X2	7	18,45	60463	58276	57018	77495	76867	76923	58586	77095
A0A3B6TQ56	60S ribosomal protein L32-1	3	24,32	42737	29733	36948	52414	44542	57103	36473	51353
A0A3B6D218	stem 28 kDa glycoprotein-like	6	40,65	48277	40432	53374	25253	26456	24716	47361	25475
A0A3B6KDF6	pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase	10	25,74	43383	29639	33987	28161	29941	33691	35670	30598
A0A1D5SRX8	60S ribosomal protein L18a	8	48,31	75634	46710	59934	45517	48848	42261	60759	45542
A0A0C4BK13	26S proteasome regulatory subunit S10B homolog B	7	31,50	39910	15141	15057	15605	16367	14095	23369	15356
A0A3B6B024	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1B	6	25,74	3610	8507	26466	31208	36521	23023	12861	30251
Q35411	translation initiation factor 5A	3	31,06	49643	35501	25387	22087	24346	16103	36844	20845
A0A3											

A0A3B6N0L6	ribonuclease TUDOR 1	14	16,60	0	0	0	25243	24864	24497	0	24868
A0A3B6RV9	adenylate kinase 3	4	23,24	24236	19829	23340	16471	18753	16485	22468	17237
A0A3B6GWV3	aspartic proteinase oxyzin-1	2	9,87	0	0	0	2082	1830	2204	0	2039
A0A077RUM9	early nodulin-like protein 1	2	19,80	30219	33129	30548	8546	9213	6850	31299	8203
A0A096USR9	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 37	10	23,19	32183	23548	23268	19439	20562	22030	26333	20677
A0A3B6B5W5	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], n	6	18,57	22084	23952	21913	25807	26677	28645	22649	27043
A0A3B6LLS3	mitochondrial outer membrane porin	4	30,55	27415	29962	30918	30141	28604	30363	29432	29703
D3KVP3	purple acid phosphatase 3	4	20,00	9988	10223	15212	6746	7417	7643	11807	7269
A0A3B6IT55	purple acid phosphatase 3	5	14,63	44093	40448	33007	20799	21696	18834	39183	20443
A0A3B6KSX8	basic transcription factor 3	2	20,90	16843	14013	17345	17670	16901	14952	16067	16508
P38076	cysteine synthase	5	21,23	27514	22500	22609	26962	26771	25511	24208	26415
A0A3B6KF3	serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory :	7	21,19	31112	29893	24068	19113	21717	19320	28358	20050
A0A3B6U1B5	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase-like	7	20,13	3729	5737	7044	8223	8206	8762	5504	8397
A0A3B5Y1K8	ERBB-3 BINDING PROTEIN 1	7	30,71	62675	23067	55831	33258	43372	41798	47191	39476
A0A3B6HY18	40S ribosomal protein S25-2	2	21,43	39374	36361	27527	33122	29518	30107	34421	30916
A0A3B6FP91	embryonic protein DC-8	6	23,04	4034	13429	24122	23982	25335	21803	13862	23707
A0A080YUV6	pectin acetyl esterase 5-like	4	13,65	22574	39084	31112	40506	45730	43372	30923	43203
A0A3B5ZSB6	nascent polypeptide-associated complex subunit beta-like	3	28,74	8757	9474	13336	15144	15744	14652	10522	15180
A0A3B6D5H6	dihydroxypropylsine-residue succinyltransferase component o	3	13,51	65841	39468	37334	28903	29190	31111	47548	29735
A0A3B6R1E0	60S ribosomal protein L22-2	2	17,56	11235	8179	11312	14913	15305	14951	10242	15056
A0A3B6SF14	probable aldo-keto reductase 1	3	13,33	5957	9154	8157	7855	8963	8539	7756	8452
A0A3B6PK86	40S ribosomal protein S24-1	2	18,98	18679	13476	21563	17339	19705	18181	17906	18408
A0A3B6NNJ8	succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	5	15,15	31076	11857	25977	19427	21834	19851	22970	20370
A0A3B6PTR2	probable voltage-gated potassium channel subunit beta	3	19,21	10601	5693	7573	6199	4220	8508	7956	6309
A0A3B6HYB1	rUBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	5	15,83	1602	4699	5982	5281	5146	4797	4094	5075
A0A3B6LMG1	probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 8D	2	15,30	58483	29976	47038	0	0	0	45166	0
A0A3B6PT84	putative aconitase hydratase, cytoplasmic	15	24,26	8524	9312	9167	0	0	0	9001	0
Q5XUV6	proteasome subunit beta type-5-A-like	2	12,19	3386	17976	20317	18138	18972	19505	13893	18871
A0A3B5V2C2	argininosuccinate synthase, chloroplastic	5	14,32	25195	20237	21396	18613	20517	21341	22276	20157
A0A3B6LYY0	ruBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	6	16,84	21198	22223	28289	27322	26621	24816	23903	26253
A0A3B6FWQ8	phosphoenolpyruvate carboxylase, housekeeping isozyme	15	20,91	9325	5827	9518	6901	8157	7344	8223	7467
A0A3B6D6N4	Vacuolar-sorting receptor 1	9	21,07	62981	67013	131550	153856	122130	179273	87181	151753
A0A3B6EJ72	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial-like	7	21,67	18209	29401	30599	26879	30730	25963	26070	27857
A0A3B6GVC0	embryonic protein DC-8	6	23,34	26821	28662	30977	33671	33898	33717	28820	33762
A0A3B5VUK3	heat shock 70 kDa protein 14	9	15,88	30095	23322	21985	17133	18963	18472	25134	18189
A0A3B5XN8	chaperonin CPN60-1, mitochondrial	7	18,47	28443	28530	36991	29107	29502	28188	31321	28932
A0A3B6FU15	predicted protein	2	13,64	72425	45296	63360	46905	51076	44964	60360	47648
A0A3B6PN63	60S ribosomal protein L6-like	6	23,28	5725	6138	6990	9495	9339	9776	6284	9537
A0A3B6MFU0	ribulose-phosphate 3-epimerase, cytoplasmic isoform	2	17,70	33992	17618	16869	18787	19206	21577	22826	19856
A0A1D6CX74	proteasome subunit alpha type-4-2	2	15,20	28519	22278	24282	24671	24837	22253	25026	23920
A0A3B6PSA8	leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	8	22,51	35247	32244	26764	22368	21380	20121	31418	21290
A0A3B6AVV4	Tubulin alpha-1 chain	8	20,79	38169	42232	32619	16737	18476	27544	37673	20919
A0A3B6LBV5	histone H1-like	2	10,93	9708	70186	73448	82376	69466	72842	51114	74895
A0A0F7GA49	WS118 protein	6	40,00	15045	15480	22028	17948	10228	18426	17518	15534
W5B985	proliferating cell nuclear antigen	5	30,80	26184	19560	25378	21972	23763	21059	23707	22265
A0A3B6EKF5	embryonic protein DC-8	3	14,14	19480	30207	28962	34573	30937	26982	26216	30831
A0A3B6RJT2	Malate dehydrogenase, chloroplastic	5	23,35	7172	9805	10133	11741	11637	11475	9037	11618
A0A3B6NV46	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal-like	5	21,13	19001	19805	27760	27358	25063	24440	22188	25620
A0A3B6Y77	chaperonin CPN60-1, mitochondrial-like	5	14,54	0	0	0	3569	3618	3457	0	3548
A0A3B6NY09	protein BTR1	5	18,83	15369	15158	17297	18112	17560	18540	15941	18071
A0A1D6CC87	sperrmidine synthase 1	3	14,51	17375	11590	21307	24066	28814	24312	16757	25730
A0A3B6B737	heat shock cognate 70 kDa protein-like	2	4,64	42039	22278	67742	56576	61744	54799	57800	57707
A0A3B6TDJ0	tricin synthase 2-like	2	11,02	12009	17103	18981	18144	20905	21811	16031	20286
A0A3B6SA6G6	aldose 1-epimerase	2	11,23	39236	35104	39338	25130	24998	26346	37893	25491
A0A077RZ13	GTP-binding protein SAR1A	5	43,01	13750	10547	15883	16595	19488	15433	13393	17172
A0A3B6SJF8	peroxiredoxin-2E-1, chloroplastic-like	4	28,82	45589	28414	30264	31167	32526	28854	34756	30849
A0A3B6H24Z	Proteasome subunit beta type-4	3	18,53	19453	22266	20184	18119	19684	17947	20634	18584
A0MAUT	transmembrane emp24 domain-containing protein p24beta2	2	14,15	13754	12916	14417	10542	11529	11359	13696	11143
A0A3B6ND9	annexin D1	3	22,63	19921	23028	13586	21367	24198	21642	18845	22402
A0A3B6MLW4	pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase	6	23,00	4678	10880	12364	9739	10846	9734	9307	10106
A0A3B6HSG5	pyruvate decarboxylase 2	6	12,73	28889	14279	17883	25794	20944	26591	20350	24443
A0A3B6JMW4	heat shock 70 kDa protein 8	5	16,35	11407	8994	9049	9793	10238	10041	9816	10024
A0A3B6TJ74	stem 28 kDa glycoprotein-like	4	18,57	14342	16531	14598	18849	21067	22784	15157	20900
A0A3B6SH48	tricin synthase 2-like	2	10,61	14946	12619	11058	12564	13798	14714	12874	13692
A0A3B6MR11	formate-tetrahydrofolate ligase	5	12,05	35527	37040	27350	24617	28441	28275	33306	27111
A0A3B6LT59	beta-glucosidase BoGH3B	5	11,06	12552	15590	15427	0	0	14523	0	0
A0A3B6MZ5	leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	9	23,06	15045	13726	11713	13662	13270	12364	13495	13099
A0A3B5YJ68	dolabadiene monoxygenase-like	5	19,05	15558	9476	15514	22383	31369	25843	13516	26532
A0A3B6EP10	noroxomaritidine/norcrassaudine reductase-like	3	18,25	16333	14455	13409	16660	15309	15061	14732	15677
A0A3B6RP99	heat shock 70 kDa protein BIP5-like	5	6,84	8683	35580	7919	3829	3462	3390	17394	3561
A0A3B5Y1L8	probable AMP deaminase	2	6,26	10803	6975	10895	10775	13188	11711	9558	11891
A0A3B6CE99	probable inactive UDP-arabinopyranose mutase 2 isoform X	4	17,53	27491	19393	14582	17007	18119	17878	20488	17668
A0A3B6IN12	Alcohol dehydrogenase 3	5	18,35	28661	26719	28320	12771	13405	12466	27900	12881
A0A3B6NX35	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin 1	3	21,46	16569	13777	13607	11166	13497	12231	14651	12298
A0A3B6AQJ9	probable ATP synthase 24 kDa subunit, mitochondrial	2	12,61	47987	43967	12866	15855	17342	15285	34940	16161
A0A3B5XWZ1	heat shock 70 kDa protein 15-like	11	17,46	19968	10167	17791	12881	12101	11618	15975	12200
A0A3B6ITL4	heat shock 70 kDa protein 8	6	18,62	20452	11592	14857	9793	10238	10041	15634	10024
A0A3B6MYC3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit,	4	12,52	16978	22164	24696	20080	23698	21212	21279	21664
W5F826	proteasome subunit beta-type-1	3	23,08	4723	10973	11515	11155	11459	13550	9070	12055
A0A3B6HPV5	protein transport protein SEC23-like	4	9,35	23229	20327	19221	22207	24202	22213	20926	22874
Q00445	heat shock protein HSP26	2	12,18	12378	5836	31230	19507	21172	17052	16481	19243
A0A3B6GOX3	uridine 5'-monophosphate synthase	2	7,94	2125	20709	20583	19397	24037	21793	14472	21742
C0KTS8	hypersensitive-induced response protein 4	2	17,36	7598	13225	8283	8476	10594	9419	9702	9496
A0A3B6MTB1	glucose-6-phosphate isomerase 1, chloroplastic	3	10,95	14248	14575	15820	14435	16054	15994	14881	15495
A0A1D5SG12	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like	2	17,16	15744	27632	22247	13204	14779	19657	15880	21874
A0A3B6KB1	alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 6	11	24,69	9810	11436	20995	29339	31795	31648	14080	30

A0A3B6EIT8	coatomer subunit beta-2	2	4,13	34594	22071	25399	23876	25051	22767	27355	23898
A0A3B6SKM4	putative p23 co-chaperone	2	8,30	12640	9735	27428	24843	23299	24630	16601	24257
A0A3B5YTP0	pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump	5	11,65	12689	9575	22380	15337	16981	14870	14882	15730
A0A3B6LV29	lysine-tRNA ligase	2	5,30	7867	1973	12774	14678	15144	15805	7538	15209
A0A3B5XK55	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic	2	4,46	20250	19220	18718	7018	7801	6816	19396	7212
A0A3B6QGE4	phosphoenolpyruvate carboxylase 1	12	13,81	3269	7052	8997	12177	12902	12106	6439	12395
A0A3B6ING7	lipoxygenase-1	6	13,28	8045	7734	11058	12966	14871	14299	8946	14045
A0A3B6SN06	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	9	10,66	14253	4305	18292	20275	17372	15722	12283	17790
A0A3B6N179	pectin acetyl esterase 3-like	2	9,29	17824	18655	20126	20805	23302	18284	18868	20797
A0A3B6THT8	aspartate aminotransferase, mitochondrial	3	10,80	25127	33172	32190	26754	31324	30040	30163	29373
A0A3B6SN8	1,4-alpha-glucan-branched enzyme, chloroplastic/amyloplast	3	4,81	43501	30514	54400	22337	18100	17719	42805	19385
A0A3B5Z432	probable nucleolar protein 5-2	2	8,04	45623	12898	33042	17318	22373	22568	30521	20753
A0A3B6TN7	fasciclin-like arabinogalactan protein 1	2	12,93	34943	43086	40699	25155	27905	25514	39576	26191
A0A3B6LID9	70 kDa heat shock protein	3	10,65	21264	28717	18794	29938	30598	30536	22925	30357
A0A3B6AXL4	succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit,	2	14,29	0	0	2001	1859	2290	0	2050	
A0A3B6TF31	polyadenylate-binding protein 2-like	2	5,80	22031	23735	20220	16654	18810	15993	21995	17152
A0A3B6KN7	methyl-CpG-binding domain-containing protein 10-like	2	6,88	6210	31384	31402	21758	20315	15180	22998	19084
A0A3B6D9C7	alanine aminotransferase 2	2	5,21	7020	5035	3102	0	0	5052	0	
A0A3B6KQX1	putative aconitase hydratase, cytoplasmic	4	9,45	15955	11538	14604	13509	14600	13728	14032	13946
A0A3B6LY00	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like 5	2	12,14	5633	3129	5822	2492	3498	4344	4861	3445
A0A341UMH5	protein transport protein Sec61 subunit alpha-like	2	4,73	13356	8213	9499	13982	14970	13214	10356	14055
A0A3B6JN4	T-complex protein 1 subunit beta	2	7,40	12607	10713	15939	14860	14390	13072	13086	14107
A0A3B6RPC7	endoplasmic reticulum homolog isoform X1	4	8,63	9875	10456	21892	22435	22015	20804	14074	21751
A0A3B6PPY5	triacylpeptidyl-peptidase 2 isoform X1	2	2,57	15683	11612	12828	12043	13800	12481	13374	12775



Victorio et al. Supplementary Table S2. List of identified and quantified proteins of the refined wheat flour (RWF) group, based on Top3 quantification.

ACCESSION	DESCRIPTION (OMICSBOX)	REPORTED PEPTIDES	SEQUENCE COVERAGE	A2 1	A2 2	A2 3	C2 1	C2 2	C2 3	384 1	384 2	384 3	389 1	389 2	389 3	AVE A2	AVE C2	AVE 384	AVE 389			
A0A3B6FU00	fructose-bisphosphate aldolase 1, cytoplasmic	17	72.01	7261	7463	7717	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7481	0	0	0			
A0A3B6C7G8	endoglucanase 11-like	11	31.30	14035	12958	14163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13719	0	0	0			
A0A1D5Y7B6	formate dehydrogenase 1, mitochondrial	13	41.34	439	783	465	0	0	0	0	0	0	0	0	0	562	0	0	0			
A0A3B9HW16	heat shock cognate 70 kDa protein 2	23	41.19	1597	1572	1825	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1665	0	0	0			
A0A3B8M098	2-isopropylmalate synthase A	16	54.68	3008	3344	3073	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3142	0	0	0			
A0A3B8AU9J	40S ribosomal protein S3-3	10	34.35	14797	1573	1226	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1426	0	0	0			
A0A3B8MLJ4	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	12	45.98	6062	5967	6369	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6042	0	0	0			
WSBVV4	Caretinulin	12	44.58	26900	28156	27371	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27476	0	0	0			
A0A2B5YX53	cell division control protein 48 homolog E-like	13	26.63	5134	5219	4043	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4799	0	0	0			
A0A3B8LH2J	heat shock cognate 70 kDa protein 2-like	9	17.20	4248	4772	4344	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4455	0	0	0			
A0A4B0PQ52	monocot kinin receptor X1	12	4.60	489	160	229	0	0	0	0	0	0	0	0	0	285	0	0	0			
A0A3B9UD25	CSE_alpha glucin 15	4	35.29	565479	515984	41203	32392	211569	114109	0	0	0	0	0	0	498222	216533	0	0			
A0A3B9U775	CSB_alpha glucin 14	4	47.59	317198	250229	169219	158873	86509	40393	0	0	0	0	0	0	245548	68258	0	0			
P04488	HMW glutelin subunit	16	27.27	89932	92728	72903	32422	28531	2805	0	0	0	0	0	0	85218	29820	0	0			
P04727	Alpha/beta gliadins clone PW8142	4	40.26	74634	57775	43268	66103	47046	30157	0	0	0	0	0	0	58595	47769	0	0			
A0A3B8K6K2	hypothetical protein TRILR3_00886	4	40.58	35898	36922	38182	20256	24467	21802	0	0	0	0	0	0	36991	22775	0	0			
A0A1D5V0H4	4-alpha-glucanotransferase DPE1, chloroplast/clam	12	33.22	19713	20019	21248	20353	18438	21626	0	0	0	0	0	0	20327	20140	0	0			
A0A3B8RUJ4	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isoform	4	9.49	0	0	0	0	0	0	594	1023	578	0	0	0	0	732	0	0			
A0A3B8LV0D	PR6 domain-containing protein	5	29.38	0	0	0	0	0	0	14780	21463	23217	0	0	0	0	19820	0	0			
A0A3B6RBG8	predicted protein	2	10.18	0	0	0	0	0	0	1787	1560	1604	0	0	0	0	1650	0	0			
A0A3B6B127	endoglucanase 11	7	22.18	0	0	0	36731	34724	37461	15451	17867	17708	0	0	0	36305	16997	0	0			
A0A3B6U5R3	Acid phosphatase 1	3	15.71	0	0	0	5878	5102	4938	5424	5378	6208	0	0	0	5306	5670	0	0			
A0A1D5UH45	galactose mutarotase-like	5	25.88	0	0	3093	3306	1647	2805	2519	2617	0	0	0	0	2682	2647	0	0			
W5FEE16	ADP-ribosylation factor 1	13	83.43	7230	7846	7773	10584	8423	8023	8071	9054	0	0	0	0	7616	9881	8383	0			
A0A3B6JQU3	serpin-ZX	3	9.09	1866	1943	2271	2229	2246	5417	4643	5063	0	0	0	0	2026	2371	5041	0			
A0A3B6MZG2	protein synthesis inhibitor II-like	2	6.87	5434	5966	5891	5638	6200	5137	4354	3474	0	0	0	0	5764	5658	4124	0			
W5E844	ribonuclease TUDOR 1	41	59.76	47978	49550	49851	59169	57568	61797	40776	44133	27230	0	0	0	49126	59511	42546	0			
A0A3B6BAE3	alanine aminotransferase 2	4	12.05	5574	7274	7255	4850	4148	3266	35226	34544	2552	0	0	0	6706	4084	2861	0			
A0A1D5US94	acetyltransferase O-methyltransferase 3-like	2	5.71	13571	12908	12149	5297	5751	10121	7072	6390	5260	0	0	0	12876	7058	6576	0			
A0A3B6QP50	probable voltage-gated potassium channel subunit b	2	10.09	15098	15475	14887	9743	6998	8008	13524	2732	0	0	0	0	15238	7887	8088	0			
A0A3B8YJ68	loldabin-like monocotonygense-like	3	8.53	19841	20863	21112	11701	9839	13590	2373	0	2799	0	0	0	2677	20605	2586	2677			
A0A3B6AW19	putative averain-like a precursor	4	59.54	16019	14243	14283	13157	18615	17756	13619	165	2289	0	0	0	14242	16957	16997	5606			
W1ZP06	W1ZP06	6	6.56	45452	48073	50340	30429	32430	12941	17570	16947	12208	22154	0	0	0	48471	15101	15917	17296		
A0A3B6GP29	endo/exocyst target specific PR60 precursor	4	31.68	88054	71707	59886	12218	32522	7599	5076	44228	142218	124946	0	0	0	3207	2277	0	0		
A0A3B9PT33	18.6 kDa class III heat shock protein-like	16	22.80	22395	16174	18290	12183	1897	23285	9837	9561	8913	12971	9427	0	0	18953	12638	9404	11199		
A0A3B8VZK4	lectin-like protein	2	17.49	1989	16998	16982	15059	21040	19924	6468	5736	7030	6320	5456	0	0	17568	16891	5951	5964		
A0A3B6AW95	putative averain-like a precursor	2	6.54	13119	14643	14249	18377	22834	27274	19781	26661	30847	21515	0	0	0	13400	18153	24722	26181		
P01083	monomeric alpha-amylase inhibitor	13	69.28	0	0	0	0	0	0	0	5013	7064	6059	0	0	0	6346	0	0	0		
A0A3B9IQ0Q	heat shock cognate 70 kDa protein-like	5	11.39	0	0	0	0	0	0	335	378	988	0	0	0	0	567	0	0			
A0A3B9PQJ3	acetyltransferase kinase, cytosolic	22	74.13	137695	136129	143725	146526	134449	0	0	0	0	0	0	0	0	12405	13635	0	0		
P11278	eukaryotic initiation factor 4A	23	65.22	33196	34900	36028	83734	93558	93024	0	0	0	29656	32394	23959	34708	90105	0	28670			
A0A3B5YU35	heat shock 70 kDa protein 4	35	67.13	61973	59499	59216	0	0	0	0	0	0	0	0	0	122361	0	0	0			
A0A3B8BC101	elongation factor-1-beta	10	72.94	72076	75405	73452	92134	99908	98108	0	0	0	12638	20467	1977	12277	73524	96717	0	101627		
A0A3B8NLNY0	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	8	31.97	3182	2699	2805	2885	2676	3081	0	0	0	0	0	0	0	43567	51668	0	0		
A0A3B8PK77	glutamyl-tRNA synthetase	16	63.69	27048	29576	31668	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29553	30135	39431	30195			
W5CV22	GTP-binding protein YPTM2	11	59.61	30223	33742	28325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30763	0	16911	20415			
A0A3B6ML50	pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotrans	18	52.48	10746	11247	11481	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7146	7603	0	0		
A0A3B6LKLN6	monoaliphatic amylase inhibitor	6	27.81	51451	44490	47050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41767	42118	0	0		
A0A3B6TR1K1	phosphoglycerate kinase, cytosolic	8	23.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P05619	gamma-interferon-specific lysosomal thiol protein	13	42.55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
A0A3B9UJ3C	gamma-interferon-specific lysosomal thiol protein	13	30.79	207348	227589	231372	19079	18983	20745	20877	7562	24626	32556	0	0	0	0	30567	0	0		
P042783	alpha-enolase	9	60.35	462294	414588	43136	609517	5014013	526235	525246	535200	440292	402912	0	0	0	0	45230	0	0		
W5CYX6	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	26	78.34	402636	422811	43120	35496	373513	362539	374687	362560	328873	322493	306887	0	0	0	0	32293	0	0	
A0A3B2ZP43	11S globulin	27	53.65	86706	24832	06875	786472	857235	85062	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
P05875	Rechain-Ser1-21C, AltName: Full=TriaaZ1	8	71.86	93291	113247	08827	104772	114671	104775	104975	104963	301761	325306	31889	0	0	0	0	77349	0	0	
A0A3B6JQ1P01	avena alpha amylase trypsin inhibitor-2	8	65.03	470794	483314	463378	464892	474933	48505	485230	486569	487322	487403	519592	0	0	0	40198	43733	0	0	
A0A1K0K0R0	alpha-gladiolin	4	22.76	11788	12899	13568	50730	24492	21113	34195	43336	38546	40823	29291	25667	20124	31111	38692	29797	0		
P16851	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2	6	54.48	358942	31792	27938	18371	18092	13663	50926	52962	74537	65833	67686	0	0	0	66319	0	0	0	
P10386	low-molecular-weight glutenin subunit	8	32.57	129953	154318	130214	136106	1509368	1360601	126294	187422	201489	1367734	1073543	1439867	0	0	0	29205	1304213	259209	0
A0A1D5VV00	16																					

A0A3B6KJ36	probable sarcosine oxidase	16	57.80	414168	444641	483229	447181	281008	284876	331984	349187	382098	456406	481969	419494	447346	337689	354423	452653
A0A3B6P1Z0	serpin-ZX	17	51.38	8800	12716	12543	27711	22259	20485	24157	18671	24701	25870	22490	23832	11353	23485	22510	23997
W5E2W7	40S ribosomal protein SA	14	59.09	94240	96835	102410	116303	106135	117420	103190	96799	107137	88814	88266	84156	97828	113395	102375	87078
A0A1D5V0T8	beta-glucosidase 26	20	49.90	23719	35728	36365	98849	77960	98216	55816	6102	62918	76640	70932	57217	32027	91675	63039	68263
P16315	Glutelin, low molecular weight subunit PTUDCD1	3	25.08	454089	432531	426804	210306	252168	297792	544000	449769	413561	139427	412635	258783	437808	253422	469110	270281
I6Q763	16.9 kDa class I heat shock protein 1-like	6	56.29	40653	40007	54778	12128	16857	19585	20767	15792	16087	14780	13074	13306	45146	16190	17618	13720
Q9XGB3	starch branching enzyme I	47	58.02	51520	52532	46275	26061	28043	27882	10437	12381	11549	27272	26928	24934	50109	27329	11456	24861
A0A3BEG67Z	carbonic anhydrase, chloroplastic isoform X1	12	70.00	64056	68581	70527	213962	160129	160054	199660	233491	174618	200309	170640	158830	67722	178048	202590	176593
A0A3BPG25	endoglucanase 11-like	17	60.49	32286	32653	35954	39676	35534	41151	30972	36380	35407	51183	34889	38047	33697	38787	34253	41373
A0A3BVYL23	60S acidic ribosomal protein P2B	6	90.18	56482	54743	52961	57945	52819	64917	60379	55345	61692	41754	52910	47222	54728	58560	59139	45795
A0A3BSY1F9	Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic	42	61.66	34850	36524	37122	11609	11647	11808	28426	29919	30181	33377	27976	28742	36165	11688	29775	30032
A0A3B6MSN4	probable sarcosine oxidase	17	60.14	19457	18174	18827	16565	16486	17426	17179	21043	22517	20486	14054	18819	16522	18782	19189	
A0A3BPNU4	limit dextrinase inhibitor	5	42.21	32689	32248	3054	25389	32643	26810	40243	26551	26777	28894	29875	23374	31828	28214	31350	27381
A0A3B6MON2	oleosin 16 kDa-like	4	41.32	21522	196051	170182	132603	9045	150739	10084	95679	85804	13963	10965	10815	193838	124586	96599	119237
A0A1D5HJU1	endoglucanase 11	16	53.61	25682	25508	28891	25705	25239	25682	17332	21511	19981	31693	30237	26989	26699	25542	19610	29642
A0A1D5V2G6	40S ribosomal protein Sa-2-like	16	58.85	39498	41830	47805	43320	47685	49113	46324	26202	27626	34218	33382	32041	43044	46705	26619	34215
A0A3B6P2C8	L-aspartate permease 2, cytosolic	12	68.50	61430	67241	66355	65324	60709	56324	52632	73455	77044	60555	64645	64045	73871	61019	73871	7503
A0A4BPH010	Methionine adenosyltransferase	22	47.81	47034	58282	50774	60531	50744	55440	10604	14936	101547	28859	71767	31444	108754	14981		
A0A3B1Y1W4	phosphate, pyrophosphate kinase 1, chloroplastic	49	75.23	26233	32383	38650	80123	81892	100598	80780	67524	99134	114690	13127	87590	82855	62551	117620	
A0A3BZCZ27	proline-RNA ligase, cytoplasmic-like	20	53.43	36098	36022	38695	28861	25704	27535	30985	42648	31671	31167	29944	31203	11320	14049	34734	34991
A0A77RTYX7	proline-RNA ligase, cytoplasmic-like	22	60.20	57233	47528	56865	161744	11793	153764	144098	17179	12045	17194	12040	140659	13210	142434	113734	
A0A0C4BK1	60S ribosomal protein L35p-1	3	29.46	17214	19494	20619	21204	19957	22514	11427	12989	13534	11658	9649	10103	21223	12553	11145	
W5BMW7	elongation factor 1-delta 1	13	67.26	214377	240245	239235	175767	188701	19290	17576	14886	17369	163942	170015	124205	231266	185686	164672	15721
A0A3BEC579	thioredoxin H	4	57.89	46664	46296	45141	42918	43818	46554	26547	21303	23710	23314	26542	25228	46034	44430	23863	25028
A0A3BEG229	pathogenesis-related protein 4	3	36.30	49082	43453	43484	31743	40251	28811	45349	28224	30633	34465	46327	19185	45910	33602	34735	33326
A0A77RTG8	Malate dehydrogenase, mitochondrial	8	54.71	39992	45677	45248	22598	22978	23899	21308	17653	19554	21520	14652	14459	43639	23159	19505	17176
A0A3B5ZC07	60S ribosomal protein L4-1-like	16	54.09	16015	180584	180543	135250	142725	142614	18575	25855	19027	87139	9643	12047	12444	50948	18763	
W5FWT6	aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	24	66.21	295638	32370	20312	367447	377556	36916	30313	28213	29418	248328	346065	370640	273710	383507	308672	321678
A0A1D6SS18	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	23	72.09	148571	150563	161470	138365	131068	130297	120679	127849	132701	132096	128680	153535	137597	126275	130805	
A0A3BSY1W9	pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic	38	59.27	39907	41810	42406	44771	44917	45716	67672	71077	47662	38956	41044	4139	45134	68195	42554	
A0A3B5XT99	gamma-gliadin	2	7.91	793372	710233	687653	311022	18126	252455	71524	36703	57789	15573	30298	2919	73049	154901	55336	25063
A0A3B6LF34	alpha-amylase/trypsin inhibitor-like	6	33.19	4670	4720	4770	3909	3981	3532	4949	4498	4549	4440	4342	3082	4720	3807	4665	3955
A0A1D6SP9	formate dehydrogenase 1, mitochondrial	13	40.40	34624	34362	34285	32084	32047	32056	30854	32056	32056	32056	32056	32056	32056	32056	32056	32056
O42313	Hsp70-H2A	3	28.60	73895	89330	91200	61111	33388	56046	63024	30437	62954	29666	49789	48897	61517	73817	54214	72408
A0A3BPKK26	predicted protein	4	19.91	63996	65004	66509	72847	73872	74131	64574	71905	116364	76318	75985	62941	65177	73817	54214	72408
F1Y493	heat shock protein 90	31	56.29	92064	94873	96703	10104	114925	127813	17893	69634	69515	73311	76292	10192	90324	116281	70594	86856
A0A3B6R010	ricin B-like lectin R4C01	19	66.28	67886	74043	71933	16136	16446	17881	18759	20407	21263	23382	24529	25861	45323	51318	11231	9230
A0A3BZ5ZT0	malate dehydrogenase, mitochondrial	9	57.48	58913	61385	67491	36302	34561	35353	39617	42994	44905	32423	33237	33237	62593	41001	12136	33481
A0A1D5U102	branching enzyme IIIa	31	44.97	20768	20305	20305	16767	16767	16767	16767	16767	16767	16767	16767	16767	16767	16767	16767	
A0A3B6WN66	betaine aldehyde dehydrogenase	22	70.72	63596	56624	61465	56061	56061	56061	56061	56061	56061	56061	56061	56061	56061	56061	56061	56061
A0A3B5ZN8	legumin 1	18	75.98	19924	19660	21625	24258	22684	24089	30421	35852	41964	38102	31614	28208	20469	23677	36511	32641
A0A3BML29	heat shock cognate 70 kDa protein-like isoform X3	22	47.60	143455	151979	156847	152109	150012	149124	147354	157435	157435	157435	157435	157435	157435	157435	157435	157435
A0A3BPKK26	Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	24	66.21	71840	78336	49359	118877	119227	12515	127476	138224	123705	72495	10075	10975	108202	66512	121106	29891
A0A3BPKH67	cationic peroxidase SCP1-like	16	54.14	49504	50833	43256	55795	56517	62623	62263	73230	87949	49300	57025	47862	58192	72043	44359	64758
A0A3B6MV97	NDR1/HIN-1-like protein 12	7	66.52	40628	44634	54477	48703	46188	53815	80367	90367	8983	67751	67751	67751	67751	67751	67751	67751
A0A1D5LZT8	actin-depolymerizing factor 3	6	40.58	42064	43828	46348	44992	42468	42468	43537	45836	45836	45836	45836	45836	45836	45836	45836	45836
A0A3B6BAR02	L-aspartate peroxidase 2, cytosolic	12	43.87	40597	45696	42496	34753	34753	34753	34753	34753	34753	34753	34753	34753	34753	34753	34753	34753
A0A3B6P0M7	peroxidase	20	47.81	70491	74847	74847	22586	22586	22586	22586	22586	22586	22586	22586	22586	22586	22586	22586	
A0A3B6P0C18	stearoyl-acyl diacylglycerol-like	10	40.40	70510	75487	74845	21742	21742	21742	21742	21742	21742	21742	21742	21742	21742	21742	21742	
A0A3B6P0G00	profilin	4	49.62	10201	60330	60399	64947	64947	64947	64947	64947	64947	64947	64947	64947	64947	64947	64947	
W5F67	60S ribosomal protein L9	9	59.26	11894	11965	144579	134373	145690	15690	15690	15690	15690	15690	15690	15690	15690	15690	15690	15690
U5HDF7	40S ribosomal protein S20	4	51.18	62800	62796	62614	51464	55784	56842	36872	3986	4003	3						

A0A2X0TY93	glutaredoxin 4H6	4	62.79	38131	38322	38803	31587	33384	33702	43848	37007	42826	39795	37399	29652	38419	32891	41227	35615
A0A3B9RH6N6	tricin synthase 2-like	8	40.82	25434	13789	30469	37807	27394	27993	41058	44965	48951	41473	50234	23231	31065	44991	42405	
A0A3B6SAG6	aldoze 1-epimerase	13	59.73	47762	61431	69241	59472	63088	43319	49429	100778	99070	105333	114866	93854	59478	55293	98032	104691
W5P46	60S acidic ribosomal protein P2A	4	74.34	52165	55107	53417	39757	51482	49302	44163	37429	46950	35079	44302	25819	53563	46847	42847	35067
Q05806	Type-5 thioin	5	64.89	66330	53342	59872	35335	28616	21928	21543	18268	16572	17064	15995	10974	59848	28626	18794	14678
A0A3BBLHF5	pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase	20	48.95	36982	38336	38875	49483	51230	70070	40037	44523	44330	45009	33945	32245	38064	51161	42963	37166
W5FGW3	60S ribosomal protein L32-1	5	46.62	44070	39373	47336	46112	38767	50961	28812	28813	32307	26147	35073	24071	43593	45280	29911	28431
W5CSN9	60S ribosomal protein L22-2	5	45.74	42010	46697	45624	38788	38086	39810	26794	26780	26928	30618	28134	21754	44777	38895	26834	26835
A0A3B9MUY3	uncharacterized protein LOC109773725	4	40.58	12541	12396	12705	10021	10536	9549	9398	7019	9185	13540	6153	8610	12547	10035	8534	9434
A0A3B6GTGN3	cytosolic isocitrate dehydrogenase [NADP]	19	64.08	38475	42376	44610	29930	30009	30523	35128	36299	37534	41197	41885	37835	41820	30154	36321	40306
A0A3B6ELC9	60S ribosomal protein L24	3	19.88	52721	64341	64307	39294	41932	44600	33798	38076	37884	38307	33126	27952	60456	41942	36586	33128
A0A3B6UCE1	ribonuclease TUDOR 1	43	57.49	66415	68592	69007	36439	35442	38046	57585	62327	59805	110764	105237	100218	68005	36643	59906	105406
A0A3B6HUM3	60S ribosomal protein L10-1	5	24.88	15151	16982	16120	13928	13745	15160	15056	17862	17308	18859	17718	16162	16084	14280	16768	17580
A0A3B6GFX2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	3	42.75	44072	43409	41998	31052	25810	31555	44817	33591	43206	25191	49920	27388	43160	29473	40538	34166
A0A3B6KMK6	60S ribosomal protein L5-1-like	9	45.03	43824	77008	52876	51032	49648	54102	59497	61940	53584	48040	46449	57900	58557	58155	49358	
A0A3B6ECX9	Translational-associated protein subunit beta	3	17.62	48162	47483	34068	30945	26926	26270	20379	21908	26655	33156	21093	43644	29665	42782	27091	
A0A3B6SH148	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like	11	48.86	56252	58300	56959	51079	52150	46990	45359	48499	46556	47974	37933	56259	48359	46407		
A0A4CBK09	60S ribosomal protein L5-1s-1	2	45.11	10694	11479	10786	15930	16225	9982	9897	10870	7347	7447	17755	7796	13746	10233	8209	8032
A0A4CBK09	small-sedimenting protein TSJ11-like	8	55.08	20207	22255	26133	26814	29603	26753	24772	20318	30248	24956	18729	22472	27723	28146	21417	
A0A3B6UCJA3	cysteine protease inhibitor 8-like	3	35.43	20922	21061	20335	12048	13444	12416	25576	20203	21206	21498	24231	19605	20773	13103	2262	22876
A0A3B6C496	predicted protein	4	40.10	26872	27468	26495	15773	16351	17288	31700	2998	28449	18278	26942	16564	2970	23942		
O13968	Late embryogenesis abundant protein, group 3	2	16.96	235016	235120	224460	46776	46689	49659	26300	48027	52312	34937	15631	28997	231542	47700	42123	26522
F4Y892	heat shock protein 90	20	37.20	53621	50388	55706	45259	39697	46975	30500	34966	31389	29232	27845	33189	53239	43977	32195	30089
A0A3B5ZN9M	photosynthetic NDH subunit of luminal location 5, cl	2	29.26	29411	32488	34786	52727	25267	25175	28703	21908	26655	33156	21093	43644	29665	42652	27091	
A0A3B5Y74	phosphoglycerate kinase, chloroplastic	6	18.62	48537	42113	27717	150514	154414	22244	158543	166507	168031	123188	12793	128446	39456	17574	164330	143796
A0A3B6LL76	phosphoenolpyruvate carboxylase	43	53.60	80785	79205	89570	80466	86557	81299	76364	94529	86587	83729	84921	69817	83187	82774	79301	79489
A0A3B5P07	U1PF0098 protein CPr_0877/CP_0992/CPj0877/CPb	7	64.24	37996	38859	37305	20282	28510	24697	16382	10292	13924	13763	8940	38054	24678	12629	11876	
A0A341P07	60S ribosomal protein L18-2	5	29.41	33245	31446	26497	27674	25890	26696	14040	10440	13019	14476	9153	13737	30396	26753	13789	16047
A0A3B6PH62	histone H1	5	19.41	21467	10568	8919	11020	11349	12532	16053	16704	12045	92452	111672	72024	11662	113935	106713	
A0A3B5ZYU5	thioredoxin H-type	4	49.21	23428	22207	24613	21908	14297	26363	16766	20918	17414	16624	14553	12994	23416	20948	13483	14724
A0A3B5ZG6	embryonic protein DC-8-like	16	31.31	53047	50873	50073	50613	50508	50501	49670	44248	48294	45202	452089	513675	515421	520893	513657	502548
A0A3B6EJ88	chlorophyll a/b binding protein	9	51.71	11559	10528	10755	8734	8734	5275	4724	4724	4724	10630	7538	7538	20207	20207	20207	
A0A3B6JM88	vein-clathrin-like storage protein At2g18540	26	32.63	64644	30784	32488	56147	52488	32488	32488	32488	32488	32488	32488	32488	32488	32488	32488	
A1YE34	60S ribosomal protein DC-8-like	21	40.08	18081	17533	16909	16331	20152	10906	12328	15618	9222	10753	11180	9267	17507	15796	12389	10400
A0A3B6MEW1	2-alkenyl reductase (NADP(+)-dependent)	9	46.36	66500	65419	68586	34374	37494	3722	28445	28466	33750	24581	23505	19105	66837	36351	30221	22397
A1YE34	60S ribosomal protein L3	13	33.16	75076	79660	78793	54172	53082	16274	14711	4711	49258	46984	43798	77910	53974	46047	46680	
A0A3B6UQJ3	Glycoside-like domain-containing protein	6	58.70	29988	27335	24438	17778	21477	18465	15016	10440	10440	13109	14476	9153	13737	30396	26753	11316
A0A3B6BKD9	pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-kinase	23	55.59	35393	40711	42454	46058	43140	45973	42613	46439	42613	20437	20437	116014	72024	11662	113935	106713
A0A3B6HPX8	alpha-amylase/trypsin inhibitor	6	38.43	32480	31975	27482	31536	31557	27466	33735	29486	22952	31136	35349	22870	30645	30167	28744	29785
A0A3B6D505	thioredoxin H	3	22.06	8322	7701	7806	11954	10771	10623	10533	10530	10530	10530	10530	10530	10530	10530	10530	
A0A3B6P9V2	60S ribosomal protein L18-2	4	26.74	40975	41545	35330	26202	28050	25472	10012	10132	11399	11112	9875	9003	39283	26514	10590	9996
A0A3B6PTJ6	dehydron 4	2	13.97	39599	31452	29559	11464	14163	14673	7280	7352	8291	7143	6763	9365	33536	14163	7641	14749
A0A3B6DEB0	staranch branching enzyme llb	14	29.14	25404	25573	22355	22964	22694	21769	34196	37890	40676	26841	30365	26181	2236	37827	32419	
A0A060AFB6	defensin-like protein 1	3	34.57	20922	23375	21724	17540	19230	16278	31749	31749	31749	15017	19770	20204	12133	22027	22027	
A0A3B6CFZ2	Caleculin	11	39.47	41275	43201	41996	80744	91732	11423	22429	20377	20377	15095	14427	44544	25271	20701	20701	
A0A3B6H7N2	late embryogenesis abundant protein Lea14-A	4	37.75	47299	46407	42037	42112	42112	42112	42112	42112	42112	18921	19022	19341	19341	19341	19341	
A0A3B6B1Q6	alpha-alpha-threhalose-phosphate synthase [UDP-for alpha]	4	46.48	58529	62025	62085	48845	48845	48845	48845	48845	48845	68681	68681	52629	62200	62200	62200	
A0A3B6EIK2	phosphoglucomutase, cytosolic	25	46.58	30724	32216	32216	46168	46168	46168	46168	46168	46168	62059	62059	52621	62571	53836	53836	
O13941	mannose-6-phosphate isomerase dismutase	4	36.57	21055	21177	20795	20205	20191	30779	30779	30779	30779	26267	26267	26193	26193	26193	26193	
O13941	glycosidase RNA-binding protein bl801-like	3	31.74	60897	59369	57217	26297	46999	36966	36966	36966	36966	14703	13100	16000	32028	32028	32028	
O13942	alpha-threhalose-phosphate synthase 1B isoform X	7	24.36	21939	20738	21608	33036	13137	25406	26940	28151	27691	23959	23374	22437	21248	23860	23844	24897
A0A3B6XW9N6	zinc carboxypeptidase 2	9	37.66	22398	18238	20691	20230	18434	25507	26079	26079	26079	18079	17632	26164	21079	20989	20989	
A0A3B6N0L8	ribulose-5-phosphate 3-kinase	18	25.40	30948	38318	31211	29458	28350	32074	43338	42695	38641	37186	36581	34759	32903	36425</		

A0A3B8CDE3	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acyl-CoA] acyltransferase	13	35.96	34508	34331	52085	37528	38628	37666	38259	35085	41462	42846	36534	40907	40308	37941	38269	40096
A0A3B8TB2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	11	36.12	26026	28922	30103	30624	30296	32324	22279	24613	23351	19678	24928	18995	28350	31081	23414	20867
A0A3B8S8B4	starch synthase 1	4	9.40	24588	25979	28132	20385	20680	21938	34509	42524	41416	33454	35016	35942	26233	21157	39483	34704
A0A3B8QD01	adenine nucleotide transporter BT1, chloroplastic/arabidopsis thaliana	4	29.60	31114	31840	35921	29615	31697	31471	40784	40123	36558	35522	34255	34051	32958	30928	39155	34699
A0A0C4BK8L	26S proteasome regulatory subunit S10B homolog E	5	19.50	19979	19880	21036	17322	18452	19308	13111	18461	20142	16689	17887	16689	20298	18360	17594	17739
W5H631	60S ribosomal protein L7-3	2	13.87	39885	92398	85058	22465	19818	22335	46000	73656	52745	14257	49385	33235	72447	21539	57567	32929
A0A3B8JH57	proteasome subunit beta type-4	5	29.22	18122	16508	18404	16612	19595	16974	15361	18954	20558	18270	14388	14611	17678	17727	18290	15756
A0A096USR9	Dead-box ATP-dependent RNA helicase 37	11	22.87	28520	32367	31338	29342	35836	30018	31837	36326	35232	39104	24778	32694	30652	31732	34465	32192
A0A3B8N100	40S ribosomal protein S15	2	21.05	13814	13543	15032	13330	13065	13526	10135	10112	10413	9894	8590	8755	14130	13307	10220	9110
W5AUH7	40S ribosomal protein S10-1	4	23.40	41259	46062	47450	48917	44786	47205	26915	31734	31394	32201	24201	24757	44924	46969	30014	27053
A0A3B5Y50A0	11S globulin seed storage protein 2-like	5	21.31	12522	11763	13758	12959	16073	13435	13856	11830	14599	20326	15909	14223	12681	14156	13428	16823
A0G3BKEK2	formate-tetrahydrololate ligase	18	36.34	8854	9461	9625	9525	9712	9334	20344	23427	22885	21151	19672	16313	9316	9524	22199	19045
W5FEV1	60S ribosomal protein L7-2	7	25.00	14297	18974	17861	49184	56784	52212	21317	2514	27441	19833	20927	19707	17044	52727	24624	20156
D3KVNP3	purine acid phosphatase 3	8	28.66	31059	34580	34585	16810	20185	18458	16720	15997	20850	27888	21540	33401	17724	17057	23426	
A0A3B6KL1Y	beta-glucosidase HoxB3-like	7	12.72	6546	6240	6161	5806	5444	41012	4017	3885	3398	5125	3334	6316	5791	3770	4043	
A0A3B6MV5	Formytryptopholate synthetase	18	36.66	21956	23574	25024	37261	40971	41062	42862	39226	37226	40294	51081	33722	33419	23518	39765	37395
Q0I0	xylose inhibitor	6	30.17	2194	3226	2161	27403	24763	25091	55313	44672	56384	40491	2071	26375	18959	17505		
A0A3B8FTJU	alpha-L-rhamnose isomerase	2	20.00	16033	20134	20235	24454	19467	18918	18086	15459	24440	12616	19767	18059	18059	17505		
A0A3B8AV4M5	Glutathione S-transferase aminotransferase 1	9	34.79	16796	17418	17118	25017	21989	24239	25114	26391	24040	27071	16780	23378	24155	27334		
A0A3B8UTJU	late embryogenesis abundant protein 31	4	24.73	5992	7206	8350	11807	15835	14436	13030	13298	15421	17262	14171	13341	7183	14026	13916	14025
DR8L83	protein disulfide isomerase-like 2-1	11	43.05	54324	55289	54889	30590	41407	39443	52026	50428	51567	51175	41123	54721	40146	51209	47958	
A0A3B6TM00	protein virilizer homolog	3	3.97	3131	2349	4138	2933	3530	3172	19470	11351	20626	26328	28642	27441	3206	3032	17149	27470
A0A3B8VYX4	Cell division protein FtsZ homolog 2-chloroplastic	3	11.99	2317	2823	2347	2655	2115	1588	2278	1947	1876	2065	1770	2002	1523	2524	1992	1963
A0A3B8Y129	predicted protein	12	37.54	28484	27693	31357	24108	29433	27927	26902	29271	28067	26280	24118	19801	28601	27156	28080	23400
A0A3B8BM5R	glutathione transferase Fos4-like	2	33.09	21504	190627	196711	208013	190113	20217	201947	230011	161454	167987	16823	24012	200784	200098	194437	192114
A0A3B8Y1Y1	ERBB-3 BINDING PROTEIN 1	8	28.93	41926	51814	43855	30496	33377	36531	29062	30561	29874	28365	36414	45865	36468	29832	30973	
A0A3B8U1B5	UTP-glucos-1-phosphate diultriflavyleraserase-like	10	23.98	7371	6888	7312	7484	6579	8759	6567	6125	5413	5728	8105	7173	7607	6415		
A0A3B8PT7	putative acetyl hydrolase, cytoplasmic	16	25.69	194037	194481	206330	51397	62189	55791	24345	23848	25107	31798	34588	24335	19828	56459	24433	
A0A3B8S2T0	chaperone protein CipB1	22	38.82	63690	62789	64067	48966	46185	49365	13541	14025	16367	13637	15041	12743	63517	48171	14644	13807
A0A341YQV0	glutamate-glyoxylate aminotransferase 2 isofrom X'	9	33.93	10025	12086	12424	7272	6575	7424	9294	11034	11489	16034	12412	8863	11513	7091	10693	12436
A0A3B8ZR06	universal stress protein Phos34	3	28.92	31189	28223	2347	18686	25052	2585	2518	16747	1947	2065	1770	2002	1523	2524	1992	1963
W5C8N6	40S ribosomal protein S6	4	32.00	38771	40360	46950	45822	44194	44429	47407	48808	45167	48942	37071	42027	43948	49261	40209	
A0A3B8FSL4	probable aldo-keto reductase 1	4	15.65	7996	7634	8297	10841	11695	12204	6887	6368	7358	6092	7221	7977	11580	6870	6339	
A0A3B8HP6E1	embryonic protein DC-8 isoform X2	6	15.72	30460	57190	53280	23361	32009	32233	63770	18027	21348	19473	37473	13462	40977	29201	34382	23469
A0A3B6QM25	leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	9	25.59	41855	44181	47687	31659	34524	34361	26148	26709	27804	29034	25118	23726	24588	33515	26677	25959
A0A1DC067	spermidine synthase	5	30.25	22284	17194	20403	18820	24497	24169	50955	17978	15978	13745	13787	13172	19968	22491	112590	114358
A0A3B8HRX1	late embryogenesis abundant protein D-34-like	6	43.38	35843	37376	38312	25092	28638	18106	16937	18632	22531	24854	15748	37177	26571	17892	21045	
A0A2X0SL3	40S ribosomal protein S6-2	4	23.20	18761	18161	18747	15826	12527	15792	10918	10199	10599	15252	18221	10556	8323	17901	14715	9672
A0A3B6JHG0	alcohol dehydrogenase 3	7	35.16	35910	37388	38423	21942	22062	22434	31411	35911	41474	38853	33937	30884	37240	22146	37168	34458
A0A3B8FSV81	cation-binding 7-kDa heat shock protein	12	24.44	31362	29048	30508	26548	28594	28594	30791	29691	29691	29679	29679	29679	29679	29679	29679	29679
A0A3B8PPF1W9	predicted protein carboxyle housekeeping isc	24	33.93	23795	24203	25354	17916	17249	17553	21081	21424	21424	21424	21424	21424	21424	21424	21424	21424
A0A3B8BDQD2	predicted protein	3	11.40	24798	24214	26523	21996	23607	23770	14989	13003	15775	21458	19964	12901	25148	20368	18949	18107
A0A3B8FTD3	sucrefructose 6-fructosyltransferase	9	22.22	88904	78532	76983	53770	61655	58924	58942	51948	57094	67645	67512	81530	59542	66958	66738	
A0A3B8JH57	late embryogenesis abundant protein 1	4	21.88	30275	31610	32104	24371	21300	24248	15198	16102	16136	14350	13599	30252	21712	13068	12905	12863
A0A3B8FTFT	prostaglandin synthase	4	28.33	17930	18409	19169	18037	20274	20976	22195	24402	23238	19161	17892	18587	22308	19863		
A0A1D5SG2L	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like	4	33.33	10247	19461	20451	20232	18120	18120	18120	18120	18120	18120	18120	18120	18120	18120	18120	
A0A1D5SRX8	60S ribosomal protein L18a	7	46.63	43627	45222	41811	27781	29279	29279	27137	27137	27137	27137	27137	27137	27137	27137	27137	
A0A3B8GSZ6	nascent polypeptide-associated complex subunit bel	2	22.16	28972	26292	23322	29277	29120	38640	20741	42933	17430	22782	24782	60377	26194	32345	29135	39096
A0A3B8T13	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial-like	4	32.82	910	9164	8429	4345	4577	4720	4179	4478	4082	2065	3686	1453	4949	3272	7659	
A0A3B8PZT13	ATP synthase subunit beta-SAT1	8	18.43	14931	15364	16084	9584	8004	3004	8104	15226	15226	7659	1172	1172	7659	7659		
A0A3B8PZT5Y	predicted protein	5	50.00	5943	6261	6699	3604	3923	3215	25058	25058	2826	2602	305	2808	2914	6298	3883	
A0A3B8PZT9	proteasome subunit beta-type A-like	2	6.45	24468	22424	24735	15899	18085	15473	1757	19531	21978	1859	16159	18856	23876	16489		
A0A3B8PZT9	predicted protein	10	25.04	45398	46883	54793	63164	62745	53642	52869	57658	6622	48961	44717	56306	49025	60001	64928	61955
A0A3B8QN0K6	cell division control protein CNP50-1, mitochondrial	9	24.56	25400	25529	25230	20139	21418</											

E0WC53	stem-specific protein TSJT1	3	16.67	7238	8502	8898	8035	10296	11040	9520	9389	7904	9420	13843	10315	8213	9790	8937	11192
A0A3B9VZE8	guanosine nucleotide diphosphatase dissociation inhib	3	9.64	20538	21198	22002	16458	18386	18831	17051	21207	19876	20228	18643	18045	21246	17892	19378	18972
A0A3B6AVR1	reactive Intermediate Deaminase A, chloroplastic	2	14.12	17564	17999	17182	13308	15199	15290	18721	17837	16976	17887	20725	15269	17581	14599	17845	17960
A0A3B6LX20	phenylacetaldelyde reductase-like	2	9.26	7265	8038	7662	9147	7787	9291	9348	11731	10744	10864	9227	9339	7655	8742	10608	9810
C0KTS8	hypersensitive-induced response protein 4	2	17.36	8552	8938	9565	10397	9722	10345	10459	10748	11515	12788	11584	11372	9018	10154	10907	11915
A0A3B6GU5	leucine-tRNA ligase, cytoplasmic-like	12	17.37	44585	46261	39814	31380	28568	27890	30920	37185	37520	33922	32052	27263	43553	29279	35208	31080
A0A3B6AZ17	2,3-dimethylmalate lyase-like	4	21.50	11223	12474	11943	8887	9297	9952	11697	12432	13870	15482	12606	13082	11880	9412	12666	13723
A0A3B5ZY1	importin subunit alpha-1b	4	11.42	11567	11248	11663	12639	13536	13245	15118	13973	15224	13328	15568	10821	11493	13140	14772	13239
A0A2X0SL52	oleosin 16 kDa	2	15.00	69395	54380	62467	38802	10940	48627	4006	37963	9238	9087	7832	62081	32789	17069	6619	
A0A3B6QK5	tripeptidyl-peptidase 2 isoform X1	11	14.03	187280	246370	228005	58770	184657	15611	74915	55423	92782	22302	119371	55429	22052	123013	74373	65701
A0A3B6EJN3	threonine synthase, chloroplast-like	4	16.63	10501	11160	11675	14011	14349	14581	16590	18319	20130	18469	16871	16111	11112	14315	18346	17151
A0A3B6FP91	embryonic protein DC-8	3	14.22	20526	21851	20086	13178	13305	13418	8899	10583	11439	12430	11700	7616	20822	13300	10307	10582
A0A3B6FTS8	1,4-alpha-glucan-branched enzyme, chloroplastic/a	3	4.81	32128	40835	45278	27518	29889	35797	24500	30643	32587	28410	31246	39414	31069	26039	30748	
A0A3B6WNQ3	glutamic oxaloacetic transaminase 2	3	10.11	16830	15036	16893	14367	13272	15362	12038	11994	12448	14727	12427	12584	16253	14334	12160	13246
A0A3B6PSZ6	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal-like	2	7.17	8456	9558	10962	7395	8438	9958	8152	7848	8346	7884	6573	5835	9666	7264	8114	6764
A0A341W916	serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa reg	7	22.22	24894	25355	28579	22099	23361	23549	22406	23365	26184	17367	22299	19195	26269	23264	19607	
A0A3B6CGF3	protein transport protein SEC13 homolog B-like	3	17.05	29468	29142	1512	22033	16256	16224	18695	14055	1822	12628	27145	18773	19383	15188		
A0A3B6BQH1	starch synthase II	7	13.44	16319	20173	22434	10584	15133	17467	15562	15564	16742	16399	13133	20465	10681	16892		
A0A2X0SH55	proline-malate-binding protein 2-like	3	7.23	14523	23920	24964	21076	21623	23792	14885	15935	17140	17428	11946	10982	21139	22464	16143	13452
A0A3B6EFK5	embryonic protein DC-8	3	14.65	12325	12582	12097	10464	15958	1765	16560	9861	6893	5131	12335	11103	7198	7295		
A0A3B5ZTA1	ras-related protein Rab7	2	17.91	23422	15234	21086	15523	14555	15732	23069	20432	25563	19345	17857	19017	15270	22318	20523	
A0A3B6LYJ8	phenylacetaldelyde reductase-like	3	18.48	7214	7838	7764	8130	7035	8338	6108	5431	6512	7057	8428	7603	7838	6017	7427	
A0A3B6GSJ8	aldehyde dehydrogenase family 2 member B7, mitox	3	10.31	15504	13061	17630	9296	8917	9145	12270	9579	11134	8491	9238	4006	15698	9119	10994	7245
A0A3B6QPU3	probable cytosolic oligopeptidase A	5	10.73	44130	49343	51370	37318	42490	40043	37027	38294	35104	37551	38909	31135	48281	39950	38277	35865
A0A3B6PPZ5	3-isopropylmalate dehydratase large subunit, chloro	3	10.87	18330	13209	14996	17201	17534	19290	17532	19778	20312	21462	18554	11398	15511	18008	19207	17138
A0A3B6RQ3	predicted protein	2	8.64	16042	16682	16390	14595	20235	20528	12470	12027	14719	11503	14937	13391	17371	18453	13072	13277
A0A3B6RN13	transketolase, chloroplastic	2	7.11	7575	9287	10289	8722	9529	10464	8599	8888	9799	10382	6499	8173	9050	9571	9095	8351
A0A341UGW3	eIF5-mimic protein	3	9.90	11862	13221	13137	12922	12924	12100	10135	11371	11458	11883	10049	10308	12740	12649	10964	10747
A0A3B6BV09	MAT-DOMAIN-CONTAINING TRANSLATION REGUL	3	6.94	14743	13899	14256	11711	12492	13300	12338	13348	11753	11378	11212	14298	12504	12115	12097	
A0A3B6YT06	pyrophosphate-energized vacuolar membrane proto	5	11.39	14517	15007	14304	15618	13466	15652	18156	14713	14713	14713	14713	14713	14713	14713	14713	14713
A0A3B5ZT77	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	3	9.66	13682	12292	13885	13229	10327	13165	5885	5975	7067	9438	7267	13276	12240	5799	7924	
A0A3B6RBH4	putative ATP synthase protein YMF19	2	8.97	143341	147271	156609	110930	106950	112757	11107	12582	11028	8987	12673	16920	149223	110215	11572	12860
A0A3B6MKZ5	Sulfurttransferase	2	11.28	14326	14920	16915	9351	8508	9533	8573	8971	10812	8533	15373	6869	15387	9131	9452	10258
A0A3B6IK02	Aminopeptidase	2	2.98	8292	8065	1193	56829	54708	73277	38919	33872	29948	35401	37020	58503	9431	61605	34246	43641
A0A3B6GK03	uridine 5'-monophosphate synthase	2	7.94	19457	20017	20010	16132	15572	16716	17074	15284	18037	14934	19048	13104	19828	16141	16798	15695
A0A3B6BTN7	fasciclin-like arabinogalactan protein 1	2	15.99	35378	36663	35663	28061	27486	29750	37790	35933	36988	42663	41687	39052	35901	28432	36903	41134
A0A3B6NST6	tripeptidyl-peptidase 2	11	14.12	6944	7597	7358	5937	5172	5508	5962	9770	8253	8345	7019	7298	5538	8711	8782	
A0A3B6PKK1	aminopeptidase M1-A	3	5.25	12935	12619	14108	11863	13594	13523	11386	11738	11850	12470	11613	10561	13221	12994	11658	11548
A0A3B6MYC3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein :	3	9.64	19578	19753	21207	15712	13753	15915	13974	14463	16552	16063	17288	12570	2017	15127	14995	15307
A0A3B6PBP2	coatomer subunit beta-2'	5	11.37	22107	25033	26242	21058	23442	24704	25507	22886	25450	27615	21758	26160	23168	25641	24665	
A0A3B6PBP6	pyruvate decarboxylase 1	2	12.25	11104	12549	14833	14737	15533	17938	13668	14143	15499	14647	11028	12772	1488	15447	15020	
A0A3B6V1X3	ASXL1-associated protein mechanism of monodehydri	2	7.13	14350	14146	13991	14217	14458	14212	15753	17507	16292	14153	17085	20038	14148	13895	16508	19518
A0A1D5UT73	26S proteasome regulatory subunit 2A homolog	2	9.35	16606	22179	24521	15991	13907	21695	27246	21922	25244	21704	18825	15987	21262	17271	24804	20599
A0A3B6HTH8	aspartate aminotransferase, mitochondrial	2	7.98	31097	30653	29422	22027	25974	26178	16555	25475	23142	24207	18300	9930	30301	24760	22301	17479
A0A3B6TQ76	V-type proton ATPase catalytic subunit A	2	7.20	6825	4772	7634	7468	7469	5919	37373	3834	3768	7667	5723	3530	6410	6952	5109	5640
A0A077RST9	glucan endo-1,3-beta glucosidase GMV	3	13.41	16207	15010	14572	15284	17853	19326	12693	15029	17340	12801	16694	12934	15833	17477	14987	14143
P20973	ubiquitin-activating enzyme E1 2	5	8.54	23274	25656	28868	22677	25620	22433	21096	17453	25801	31198	23675	22911	25932	23577	21450	25721
A0A3B6FTJ3	glycine-tRNA ligase, mitochondrial 1-like	2	2.83	22371	18818	16526	23891	24697	20061	7756	21838	8324	4694	20955	6835	19238	22883	12641	10825
A0A3B6DNK6	fructosyl transferase	2	2.68	7934	9335	9282	10123	9890	9383	7860	7639	8681	8447	7105	8850	9799	8060	7469	
A0A3B6WJM4	heat shock 70 kDa protein 8	2	4.99	11319	10413	12821	10057	10921	11958	4804	5431	6248	7267	5436	5003	11517	10979	5494	5902
A0A3B6TS88	probable LIM domain-containing serine/threonine-pr	5	8.94	12009	12322	12052	16762	17518	19516	16657	19226	17339	16658	12126	17932	17740	17030		
A0A3B6KLA0	T-complex protein 1 subunit beta	2	7.01	16697	15770	16514	13712	13058	14545	12055	11876	12250	13231	10369	11144	16327	13772	12096	11611
A0A3B6RH2D	alcohol dehydrogenase	2	8.43	21187	17581	20207	35939	16262	42669	18409	18198	10540	20392	21730	20450	19650	31623	17516	20857
A0A3B6HSG5	pyruvate decarboxylase 2																		



Victorio et al. Supplementary Table S3. WWF Functional annotation data obtained by OmicsBOX software



Vobria et al. Supplementary Table 33. RWF Functional annotation data obtained by ORCHIDBOX software

SEQUENCE	DESCRIPTION	LENGTH	RTS	E-VALUE	SMI MEAN	# GO	GO NAMES	EC1 CODES	ENGINE NAMES	INTERPRO ID	INTERPRO ID	INTERPRO ID	INTERPRO ID	
ADAB387C1A	fluorophenyl-propanoate	20	0	9.57	2	P-0000324	Prokaryotic proline: Proline	EC1.2.1; EC1.2.2	Fatty-acid-activated	IPI00783-02024	IPI00783-02024	IPI00783-02024	IPI00783-02024	
ADAB387C07	endoglycosidase 11-like	508	20	9.28	2	P-0000324	Prokaryotic catalytic process	EC1.2.4	Cellulase	IPI00701 (Pfam)	IPI00701 (Pfam)	IPI00705 (Pfam)	IPI00705 (Pfam)	
ADAB387YH1	formate dehydrogenase 1, r	358	20	9.73	6	P-0000305	Prokaryotic process: Prokaryotic	EC1.1; EC1.17.10	E Action on the CH-OH group of donors. NAD or NADP as acceptor: F-NAD binding	IPI00645 (Pfam)	IPI00645 (Pfam)	IPI00616 (Pfam)	IPI00616 (Pfam)	
ADAB387C01	formate dehydrogenase 1, r	559	20	9.73	6	P-0000305	Prokaryotic process: Prokaryotic	EC1.1; EC1.17.10	E Action on the CH-OH group of donors. NAD or NADP as acceptor: F-NAD binding	IPI00645 (Pfam)	IPI00645 (Pfam)	IPI00616 (Pfam)	IPI00616 (Pfam)	
ADAB387C06	2-ketocysteate lyase 1	481	20	9.15	4	P-0000308	Prokaryotic-chain amino acid	EC2.3.3	2-oxoacylomoyl synthase	IPI00651 (PRINTS)	IPI00651 (PRINTS)	IPI00626 (PRINTS)	IPI00626 (PRINTS)	
ADAB387A02	40S ribosomal protein S33	230	20	9.74	6	P-0000341	Prokaryotic process: Prokaryotic	EC1.2.2; EC1.2.3	Cell	IPI00649 (PRINTS)	IPI00649 (PRINTS)	IPI00649 (PRINTS)	IPI00649 (PRINTS)	
ADAB387A03	40S ribosomal protein S33	231	20	9.74	6	P-0000341	Prokaryotic process: Prokaryotic	EC1.2.2; EC1.2.3	Cell	IPI00649 (PRINTS)	IPI00649 (PRINTS)	IPI00649 (PRINTS)	IPI00649 (PRINTS)	
W387V44	Catechol	415	20	9.83	7	P-0000345	Prokaryotic function: Prokaryotic-dependent RADAR pathway	EC1.2.1; EC1.2.2	H+transporter activity	IPI00652 (PRINTS)	IPI00652 (PRINTS)	IPI00652 (PRINTS)	IPI00652 (PRINTS)	
ADAB387A04	dimethylaminopropyl kinase 4	500	20	9.69	3	P-0000345	Prokaryotic function: Prokaryotic-dependent RADAR pathway	EC1.2.1; EC1.2.2	H+transporter activity	IPI00652 (PRINTS)	IPI00652 (PRINTS)	IPI00652 (PRINTS)	IPI00652 (PRINTS)	
ADAB387H22	heat shock cognate 70 kDa	593	20	8.0	88.97	10	P-0000342	Prokaryotic response to unfolded protein: Protein refolding	Prokaryotic	Fatty-acid-activated	IPI00653 (PRINTS)	IPI00653 (PRINTS)	IPI00653 (PRINTS)	IPI00653 (PRINTS)
ADAB387A24	phosphatase isoform X1	509	20	8.67	3	P-0000342	Prokaryotic response to unfolded protein: Protein refolding	Prokaryotic	Fatty-acid-activated	IPI00653 (PRINTS)	IPI00653 (PRINTS)	IPI00653 (PRINTS)	IPI00653 (PRINTS)	
ADAB387J75	CSP, alpha-gladin 14	145	20	1.91E-02	98.14	1	P-0000387	Fimocaric function	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)
ADAB387K01	MHC class I chain-related protein	860	20	9.69	3	P-0000387	Fimocaric function	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	
P04727	PP2C domain	313	20	9.87	1	P-0000387	Fimocaric function	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	
ADAB387K02	isolectin-binding protein TRi6	138	20	9.81	1	P-0000387	Fimocaric function	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	IPI00654 (PRINTS)	
ADAB387R04	Fruuctose-biphosphate isomerase	390	20	9.0	8	P-0000305	Prokaryotic catalytic process	EC1.2.1; EC1.2.5	EC1	4-phosphate-isomerase	IPI00655 (PRINTS)	IPI00655 (PRINTS)	IPI00655 (PRINTS)	IPI00655 (PRINTS)
ADAB387V08	PMB-domain-containing orchid	327	20	9.64	1	P-0000305	Prokaryotic catalytic process	EC1.2.1; EC1.2.5	EC1	Fatty-acid-activated	IPI00655 (PRINTS)	IPI00655 (PRINTS)	IPI00655 (PRINTS)	IPI00655 (PRINTS)
ADAB387A23	endoglucanase 1	249	20	4.1E-163	98.13	1	P-0000324	Prokaryotic catalytic process	EC1.2.3; EC1.2.4	Cellulase	IPI00656 (PRINTS)	IPI00656 (PRINTS)	IPI00656 (PRINTS)	IPI00656 (PRINTS)
ADAB387A24	endoglucanase 1	505	20	8.61	2	P-0000324	Prokaryotic catalytic process	EC1.2.3; EC1.2.4	Cellulase	IPI00656 (PRINTS)	IPI00656 (PRINTS)	IPI00656 (PRINTS)	IPI00656 (PRINTS)	
ADAB387L44	galactose-mutarotase	311	20	9.28	4	P-0000324	Prokaryotic catalytic process	EC1.3; EC1.3.3	Galactose 1-4 mutarotase	IPI00656 (PRINTS)	IPI00656 (PRINTS)	IPI00656 (PRINTS)	IPI00656 (PRINTS)	
W387F16	ADP-ribosylation factor 1	181	20	7.6E-133	97.54	12	P-0000176	Prokaryotic translation: P-protein complex	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00657 (PRINTS)	IPI00657 (PRINTS)	IPI00657 (PRINTS)	IPI00657 (PRINTS)
ADAB387A25	protein tyrosine inhibitor II	291	20	9.74	3	P-0000341	Prokaryotic process: Preprocesses to EC1.2.1	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00658 (PRINTS)	IPI00658 (PRINTS)	IPI00658 (PRINTS)	IPI00658 (PRINTS)	
ADAB387A26	alpha-enol-kinase	556	20	9.62	9	P-0000395	Prokaryotic process: Fts	EC2.2.1; EC2.6.1	2-oxoacylomoyl synthase	IPI00659 (PRINTS)	IPI00659 (PRINTS)	IPI00659 (PRINTS)	IPI00659 (PRINTS)	
ADAB387U34	acetylcoenzyme A thioesterase	150	20	9.84	4	P-0000341	Prokaryotic process: Preprocesses to EC1.2.1	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00660 (PRINTS)	IPI00660 (PRINTS)	IPI00660 (PRINTS)	IPI00660 (PRINTS)	
ADAB387A27	transdeoxyribose monosaccharide	504	20	8.74	5	P-0000164	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00661 (PRINTS)	IPI00661 (PRINTS)	IPI00661 (PRINTS)	IPI00661 (PRINTS)	
ADAB387A28	putative peptidase 1	112	20	1.2E-277	93.49	5	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00662 (PRINTS)	IPI00662 (PRINTS)	IPI00662 (PRINTS)	IPI00662 (PRINTS)
ADAB387A29	endonuclease III-like cell wall	101	20	9.81	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00663 (PRINTS)	IPI00663 (PRINTS)	IPI00663 (PRINTS)	IPI00663 (PRINTS)	
ADAB387A30	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	170	20	9.81	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00664 (PRINTS)	IPI00664 (PRINTS)	IPI00664 (PRINTS)	IPI00664 (PRINTS)	
ADAB387A31	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	183	20	1.9E-021	80.7	6	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00665 (PRINTS)	IPI00665 (PRINTS)	IPI00665 (PRINTS)	IPI00665 (PRINTS)
ADAB387A32	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	7.6E-133	97.54	12	P-0000176	Prokaryotic translation: P-protein complex	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00666 (PRINTS)	IPI00666 (PRINTS)	IPI00666 (PRINTS)	IPI00666 (PRINTS)
ADAB387A33	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	183	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00667 (PRINTS)	IPI00667 (PRINTS)	IPI00667 (PRINTS)	IPI00667 (PRINTS)	
ADAB387A34	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00668 (PRINTS)	IPI00668 (PRINTS)	IPI00668 (PRINTS)	IPI00668 (PRINTS)	
ADAB387A35	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00669 (PRINTS)	IPI00669 (PRINTS)	IPI00669 (PRINTS)	IPI00669 (PRINTS)	
ADAB387A36	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00670 (PRINTS)	IPI00670 (PRINTS)	IPI00670 (PRINTS)	IPI00670 (PRINTS)	
ADAB387A37	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00671 (PRINTS)	IPI00671 (PRINTS)	IPI00671 (PRINTS)	IPI00671 (PRINTS)	
ADAB387A38	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00672 (PRINTS)	IPI00672 (PRINTS)	IPI00672 (PRINTS)	IPI00672 (PRINTS)	
ADAB387A39	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00673 (PRINTS)	IPI00673 (PRINTS)	IPI00673 (PRINTS)	IPI00673 (PRINTS)	
ADAB387A40	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00674 (PRINTS)	IPI00674 (PRINTS)	IPI00674 (PRINTS)	IPI00674 (PRINTS)	
ADAB387A41	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00675 (PRINTS)	IPI00675 (PRINTS)	IPI00675 (PRINTS)	IPI00675 (PRINTS)	
ADAB387A42	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00676 (PRINTS)	IPI00676 (PRINTS)	IPI00676 (PRINTS)	IPI00676 (PRINTS)	
ADAB387A43	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00677 (PRINTS)	IPI00677 (PRINTS)	IPI00677 (PRINTS)	IPI00677 (PRINTS)	
ADAB387A44	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00678 (PRINTS)	IPI00678 (PRINTS)	IPI00678 (PRINTS)	IPI00678 (PRINTS)	
ADAB387A45	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00679 (PRINTS)	IPI00679 (PRINTS)	IPI00679 (PRINTS)	IPI00679 (PRINTS)	
ADAB387A46	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00680 (PRINTS)	IPI00680 (PRINTS)	IPI00680 (PRINTS)	IPI00680 (PRINTS)	
ADAB387A47	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00681 (PRINTS)	IPI00681 (PRINTS)	IPI00681 (PRINTS)	IPI00681 (PRINTS)	
ADAB387A48	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00682 (PRINTS)	IPI00682 (PRINTS)	IPI00682 (PRINTS)	IPI00682 (PRINTS)	
ADAB387A49	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00683 (PRINTS)	IPI00683 (PRINTS)	IPI00683 (PRINTS)	IPI00683 (PRINTS)	
ADAB387A50	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00684 (PRINTS)	IPI00684 (PRINTS)	IPI00684 (PRINTS)	IPI00684 (PRINTS)	
ADAB387A51	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00685 (PRINTS)	IPI00685 (PRINTS)	IPI00685 (PRINTS)	IPI00685 (PRINTS)	
ADAB387A52	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00686 (PRINTS)	IPI00686 (PRINTS)	IPI00686 (PRINTS)	IPI00686 (PRINTS)	
ADAB387A53	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00687 (PRINTS)	IPI00687 (PRINTS)	IPI00687 (PRINTS)	IPI00687 (PRINTS)	
ADAB387A54	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00688 (PRINTS)	IPI00688 (PRINTS)	IPI00688 (PRINTS)	IPI00688 (PRINTS)	
ADAB387A55	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00689 (PRINTS)	IPI00689 (PRINTS)	IPI00689 (PRINTS)	IPI00689 (PRINTS)	
ADAB387A56	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00690 (PRINTS)	IPI00690 (PRINTS)	IPI00690 (PRINTS)	IPI00690 (PRINTS)	
ADAB387A57	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00691 (PRINTS)	IPI00691 (PRINTS)	IPI00691 (PRINTS)	IPI00691 (PRINTS)	
ADAB387A58	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00692 (PRINTS)	IPI00692 (PRINTS)	IPI00692 (PRINTS)	IPI00692 (PRINTS)	
ADAB387A59	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00693 (PRINTS)	IPI00693 (PRINTS)	IPI00693 (PRINTS)	IPI00693 (PRINTS)	
ADAB387A60	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00694 (PRINTS)	IPI00694 (PRINTS)	IPI00694 (PRINTS)	IPI00694 (PRINTS)	
ADAB387A61	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00695 (PRINTS)	IPI00695 (PRINTS)	IPI00695 (PRINTS)	IPI00695 (PRINTS)	
ADAB387A62	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00696 (PRINTS)	IPI00696 (PRINTS)	IPI00696 (PRINTS)	IPI00696 (PRINTS)	
ADAB387A63	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00697 (PRINTS)	IPI00697 (PRINTS)	IPI00697 (PRINTS)	IPI00697 (PRINTS)	
ADAB387A64	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H+transporter activity	IPI00698 (PRINTS)	IPI00698 (PRINTS)	IPI00698 (PRINTS)	IPI00698 (PRINTS)	
ADAB387A65	endo-beta-N-acetylmuramoyl peptidase	181	20	9.74	1	P-0000341	Prokaryotic function: Fts	EC1.2.1	H					

AB38594M	60S ribosomal protein L12-1	302	20	0	98.99	4	P-G000641	Praslinase. Structural constituent of ribosome. F'RNA binding. C:ribosome	IPR053451 PRINTIN_F_G000641_735_F_G000641	F:0000097 dual constituent of ribosome. F':55' RNA binding: C:ribosome
AB38594O	Transposon-associated prote	192	20	6	94.93	3	P-G000679	C-terminal peptide. C:terminalic acid	IPR057319 (PRINTIN_F_G000679_192_F_G000679)	no GO terms
AB38594Q	guanine nucleotide-binding p	335	20	0	94.04	9	P-G000679	Proteinase inhibitor. F:protein response to fungus	IPR020427 PRINTIN_F_G000679_192_F_G000679	F:protein binding
AB38594P	ATP-binding cassette, subfam	149	20	0	93.65	7	P-G000679	Proteinase inhibitor. F:protein response to fungus	IPR020427 PRINTIN_F_G000679_192_F_G000679	F:protein binding
AB38594L	ATPase, AAA+ domain	972	20	0	98.71	8	P-G000660	Proteinase inhibitor. F:protein response to fungus	IPR02135 (PRINTIN_F_G000660_192_F_G000660)	F:protein binding
AB38594C	60S ribosomal protein L5a-6	112	20	0	95.37	4	P-G000621	Protoplaste formation. F:protein subunit translocation	IPR036611 (PRINTIN_F_G000621_192_F_G000621)	C:GO:000736; C:GO:000736; C:GO:000736
AB38594R	stem-specific protein T3.7T	236	20	2.58E-06	96.61	1	C-G000585	C:plasma membrane	IPR020555 (PRINTIN_F_G000585_192_F_G000585)	no GO terms
AB38594N	late endomembrane subunit	157	20	0	98.79	2	P-G000695	Fissionase regulatory activity	IPR036758 (PRINTIN_F_G000695_192_F_G000695)	cellular process; C:GO:000709; C:GO:000709
AB38594B	predicted protein	197	20	4.68E-19	92.83					
AB38594I	late endomembrane subunit	224	20	0	1.00E-04					
AB38594Y	late endomembrane subunit	707	20	0	97.21	10	P-G000645	Praslinase. F:protein stabilization. F:protein binding	IPR020275 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	F:unfolded protein binds
AB38594K	photolytic NADH subunit	188	20	3.14E-137	96.7	7	P-G000645	Praslinase. Praslinase	IPR02130 (PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645)	peptidyl isomerase
AB38594U	ATP-binding cassette, subfam	479	20	0	95.51	8	P-G000645	Praslinase. Praslinase	IPR020427 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	F:protein binding
AB38594L	ATPase, AAA+ domain	972	20	0	98.71	9	P-G000645	Praslinase. Praslinase	IPR02135 (PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645)	F:protein binding
AB38594D	ATP-binding cassette, subfam	165	20	3.34E-127	91.11	10	P-G000645	Praslinase. Praslinase	IPR02135 (PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645)	F:protein binding
AB38594W	late endomembrane subunit	157	20	2.58E-06	97.04	5	P-G000633	Praslinase assembly. Praslinase positioning	IPR036519 (PRINTIN_F_G000633_192_F_G000633)	C:GO:000736; C:GO:000736
AB38594Z	late endomembrane subunit	191	20	4.70E-124	85.87	6	P-G000428	Palmitoleate metabolism	IPR020555 (PRINTIN_F_G000428_192_F_G000428)	no GO terms
AB38594T	60S ribosomal protein L1a	104	20	9.34E-05	98.62	7	P-G000641	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000641_192_F_G000641	C:GO:000736
AB38594H	2-ketodehydrogenase (NADP)	343	20	0	93.98	8	P-G000244	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000244_192_F_G000244	2-ketodehydrogenase (NADP)
AB38594G	ATP-binding cassette, subfam	129	20	1.23E-08	88.09	1	F-G001892	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G001892_192_F_G001892	EC 2.3.1.1; EC 2.7.1.1; Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594N	photolytic NADH subunit	617	20	0	97.17	2	P-G000605	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000605_192_F_G000605	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594O	ATPase, AAA+ domain	239	20	3.02E-087	97.01	3	P-G000605	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000605_192_F_G000605	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594W	Chitosanase	141	20	0	97.23	4	P-G000607	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000607_192_F_G000607	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594Z	late endomembrane storage prote	493	20	0	88.51	5	P-G000697	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000697_192_F_G000697	Dihydroxyacetone-phosphate
AYE131	ribosomal protein L3	389	20	0	98.88	6	P-G000602	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000602_192_F_G000602	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594B	cytosolic, specific dehydro-	409	20	0	98.13	7	P-G000602	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000602_192_F_G000602	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594C	ATP-binding cassette, subfam	152	20	1.28E-011	98.65	8	P-G000602	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000602_192_F_G000602	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594D	transmembrane protein	136	20	3.58E-06	81.88	9	P-G000681	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000681_192_F_G000681	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594F	2-ketodehydrogenase	178	20	0	98.05	10	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594K	ATP-binding cassette, subfam	450	20	0	98.05	11	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594L	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	12	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594M	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	13	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594N	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	14	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594P	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	15	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594Q	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	16	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594R	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	17	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594S	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	18	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594T	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	19	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594U	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	20	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594V	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	21	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594W	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	22	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594X	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	23	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594Y	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	24	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594Z	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	25	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594A	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	26	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594B	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	27	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594C	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	28	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594D	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	29	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594E	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	30	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594F	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	31	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594G	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	32	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594H	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	33	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594I	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	34	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594J	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	35	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594K	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	36	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594L	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	37	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594M	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	38	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594N	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	39	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594O	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	40	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594P	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	41	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594Q	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	42	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594R	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	43	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594S	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	44	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594T	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	45	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594U	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	46	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594V	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	47	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594W	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	48	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594X	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	49	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594Y	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	50	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594Z	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	51	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594A	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	52	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594B	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	53	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594C	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	54	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594D	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	55	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594E	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	56	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594F	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	57	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594G	ATP-binding cassette, subfam	263	20	0	98.05	58	P-G000645	Palmitoleate. Palmitoleate	IPR020235 PRINTIN_F_G000645_192_F_G000645	Dihydroxyacetone-phosphate
AB38594H	ATP-binding									



Victorio et al. Supplementary Table S5. Protein distribution in the three GO categories for the WWF group.

Biological Process	Count_BP	Molecular function	Count_MF	Cellular component	Count_CC
translation	32	ATP binding	48	cytosol	64
carbohydrate metabolic process	31	oxidoreductase activity	40	extracellular region	62
protein folding	30	enzyme regulator activity	33	cytoplasm	61
response to stress	25	structural constituent of ribosome	38	nucleus	57
tricarboxylic acid cycle	11	nutrient reservoir activity	44	cytosolic large ribosomal subunit	23
biosynthetic process	10	RNA binding	35	mitochondrion	22
cellular response to unfolded protein	10	DNA binding	15	cytosolic small ribosomal subunit	18
glycogen biosynthetic process	9	peptidase activity	14	endoplasmic reticulum	13
lipid metabolic process	8	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	13	amyloplast	12
ribosomal large subunit assembly	8	GTPase activity	11	extracellular space	11
ribosomal small subunit assembly	8	unfolded protein binding	10	chloroplast	11
catabolic process	6	protein binding	9	ribosome	9
cytoplasmic translation	6	lyase activity	9	plastid	7
glucose metabolic process	6	isomerase activity	9	Golgi apparatus	6
polysaccharide catabolic process	5	magnesium ion binding	8	vacuole	6
pyruvate metabolic process	5	chitinase activity	8	integral component of membrane	5
ubiquitin-dependent ERAD pathway	5	ion binding	7	plasma membrane	5
cellular amino acid metabolic process	4	mRNA binding	7	mitochondrial inner membrane	4
cellulose catabolic process	4	L-malate dehydrogenase activity	5	peroxisome	4
cytoplasmic translational initiation	4	1,4-alpha-glucan branching enzyme activity	5	mitochondrial proton-transferring ATP synthase com	3
fructose 6-phosphate metabolic process	4	phosphoenolpyruvate carboxylase activity	4	lipid droplet	3
glutathione metabolic process	4	glutathione transferase activity	4	nucleolus	3
glycolytic process	4	transmembrane transporter activity	4	cytoskeleton	2
immune system process	4	translation factor activity, RNA binding	4	nucleosome	2
microtubule cytoskeleton organization	4	thioredoxin peroxidase activity	4	endoplasmic reticulum lumen	2
mitochondrial ATP synthesis coupled protor	4	sucrose synthase activity	4	proteasome regulatory particle, base subcomplex	2
protein refolding	4	structural molecule activity	3	chaperonin-containing T-complex	2
small molecule metabolic process	4	RNA helicase activity	4	cytosol	2
sucrose metabolic process	4	L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase epsilon	4	mitochondrial matrix	2
sulfur compound metabolic process	4	kinase activity	4	mitochondrial respiratory chain complex II, succinate	2
reproduction	3	cellulase activity	4	protein-containing complex	1
ATP synthesis coupled proton transport	3	calcium ion binding	4	mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex	1
cell redox homeostasis	3	6-phosphofructokinase activity	4	external encapsulating structure	1
cellular protein modification process	3	triose-phosphate isomerase activity	3	mitochondrial outer membrane	1
chromosome organization	3	threonine-type endopeptidase activity	3	protein phosphatase type 2A complex	1
dephosphorylation	3	serine-type endopeptidase inhibitor activity	3	endosome	1
generation of precursor metabolites and en	3	manganese ion binding	3	PCNA complex	1
gluconeogenesis	3	lipid binding	3	endoplasmic reticulum membrane	1
intracellular protein transport	3	L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase	3	endoplasmic reticulum	1
maturation of SSU-rRNA from tricistronic rR	3	glycogen (starch) synthase activity	3	cell wall	1
methionine biosynthetic process	3	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3	COPII vesicle coat	1
negative regulation of catalytic activity	3	beta-glucosidase activity	3	mitochondrial proton-transferring ATP synthase, stat	1
nucleobase-containing compound catabolic	3	acid phosphatase activity	3	Golgi membrane	1
plant-type cell wall biogenesis	3	5-methyltetrahydropteroylglutamate-homo	3	Sec61 translocon complex	1
proteasomal protein catabolic process	3	phosphatase activity	2	vacuolar membrane	1
protein targeting	3	fructose-bisphosphate aldolase activity	2		
protein transport	3	double-stranded DNA binding	2		
proteolysis	3	alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity	2		
starch biosynthetic process	3	aldehyde dehydrogenase (NAD+) activity	2		
translational elongation	3	2-alkenal reductase [NAD(P)+] activity	2		
transport	3	xylose isomerase activity	2		
cellular nitrogen compound metabolic proce	2	UT glucose-1-phosphate uridylyltransferase	2		
cellular response to anoxia	2	translation elongation factor activity	2		
cellular response to heat	2	superoxide dismutase activity	2		
cellular response to oxidative stress	2	succinate dehydrogenase (ubiquinone) activ	2		
D-xylene catabolic process	2	protein kinase C binding	2		
fatty acid biosynthetic process	2	proline-tRNA ligase activity	2		
glycogen metabolic process	2	methyltransferase activity	2		
mRNA processing	2	malate dehydrogenase (decarboxylating) (N	2		
negative regulation of endopeptidase activit	2	ligase activity	2		
NLS-bearing protein import into nucleus	2	glycosyltransferase activity	2		

nucleosome assembly	2	betaine-aldehyde dehydrogenase activity	2
positive regulation of protein phosphorylation	2	ATADP antiporter activity	2
prolyl-tRNA aminoacylation	2	peroxidase activity	1
protein import into nucleus	2	pectin acetylesterase activity	1
regulation of transcription, DNA-templated	2	orotate phosphoribosyltransferase activity	1
response to heat	2	glutamate-ammonia ligase activity	1
rRNA processing	2	glutamate 5-kinase activity	1
acetyl-CoA biosynthetic process from pyruv	1	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity	1
anatomical structure development	1	aldose 1-epimerase activity	1
aromatic compound biosynthetic process	1	alcohol dehydrogenase activity, zinc-depend	1
box C/D RNA 3'-end processing	1	adenylate kinase activity	1
branched-chain amino acid biosynthetic pro	1	zinc ion binding	1
cell wall organization	1	water channel activity	1
cell wall organization or biogenesis	1	voltage-gated anion channel activity	1
cellular aldehyde metabolic process	1	UDP-arabinopyranose mutase activity	1
circadian rhythm	1	tRNA binding	1
cytoplasmic translational elongation	1	translation initiation factor activity	1
de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic	1	transferase activity, transferring alkyl or aryl	1
defense response	1	transferase activity	1
ethanol oxidation	1	transaldolase activity	1
fatty acid beta-oxidation	1	succinate-semialdehyde dehydrogenase (NAD+	1
glucan catabolic process	1	spermidine synthase activity	1
glucose catabolic process	1	single-stranded DNA binding	1
glutamine biosynthetic process	1	signal sequence binding	1
hydrogen peroxide catabolic process	1	sarcosine oxidase activity	1
IMP salvage	1	ribulose-phosphate 3-epimerase activity	1
isoleucine biosynthetic process	1	ribonuclease activity	1
leading strand elongation	1	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring	1
L-serine catabolic process	1	protein tag	1
lysyl-tRNA aminoacylation	1	phosphogluconate dehydrogenase (decarbc	1
maturity of LSU-rRNA	1	O-methyltransferase activity	1
mitochondrion organization	1	nuclear localization sequence binding	1
negative regulation of translation	1	NADPH dehydrogenase (quinone) activity	1
nuclear migration	1	methylmalonate-semialdehyde dehydrogen	1
pentose-phosphate shunt, non-oxidative br	1	L-ascorbate peroxidase activity	1
pentose-phosphate shunt, oxidative branch	1	lactoylglutathione lyase activity	1
phosphorylation	1	ketol-acid reductoisomerase activity	1
plant-type hypersensitive response	1	inorganic diphosphatase activity	1
polyamine biosynthetic process	1	GTPase activator activity	1
positive regulation of RNA polymerase II tra	1	glycine hydroxymethyltransferase activity	1
positive regulation of translational fidelity	1	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransfe	1
protein dephosphorylation	1	dihydrolipoyl dehydrogenase activity	1
protein ubiquitination	1	citrate (Si)-synthase activity	1
proton transmembrane transport	1	chromatin binding	1
purine nucleotide metabolic process	1	catalase activity	1
regulation of COPII vesicle coating	1	AMP deaminase activity	1
regulation of gene expression	1	actin monomer binding	1
removal of superoxide radicals	1	actin filament binding	1
response to bacterium	1	acetyl-CoA C-acyltransferase activity	1
response to cold	1	2-isopropylmalate synthase activity	1
response to desiccation	1		
response to iron ion	1		
response to oxidative stress	1		
response to reactive oxygen species	1		
response to water deprivation	1		
ribosomal subunit export from nucleus	1		
ribosome biogenesis	1		
signal transduction	1		
SRP-dependent cotranslational protein targ	1		
thymine catabolic process	1		
translational initiation	1		
transmembrane transport	1		
trehalose biosynthetic process	1		
ubiquitin-dependent protein catabolic proces	1		



Victorio et al. Supplementary Table S5. Protein distribution in the three GO categories for the RWF group.

Biological Process	Count_BP	Molecular Function	Count_MF	Cellular Component	Count_CC
translation	39	ATP binding	59	cytoplasm	74
carbohydrate metabolic process	37	oxidoreductase activity	45	cytosol	72
protein folding	32	nutrient reservoir activity	49	nucleus	71
response to stress	27	structural constituent of ribosome	42	extracellular region	63
biosynthetic process	14	enzyme regulator activity	37	mitochondrion	31
glycogen biosynthetic process	13	RNA binding	37	cytosolic large ribosomal subunit	26
catabolic process	11	GTPase activity	18	amyloplast	20
glucose metabolic process	11	peptidase activity	17	cytosolic small ribosomal subunit	19
cellular response to unfolded protein	10	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	16	chloroplast	18
cytoplasmic translation	10	DNA binding	15	extracellular space	15
tricarboxylic acid cycle	10	lyase activity	13	endoplasmic reticulum	14
ubiquitin-dependent ERAD pathway	9	ion binding	13	Golgi apparatus	10
ribosomal small subunit assembly	8	kinase activity	11	integral component of membrane	10
cellular protein modification process	7	protein binding	11	plastid	10
immune system process	7	isomerase activity	10	ribosome	10
lipid metabolic process	7	magnesium ion binding	9	plasma membrane	9
ribosomal large subunit assembly	7	unfolded protein binding	9	vacuole	8
ATP synthesis coupled proton transport	6	6 1,4-alpha-glucan branching enzyme activity	8	peroxisome	5
cellular amino acid metabolic process	6	chitinase activity	8	chloroplast stroma	4
cellulose catabolic process	6	glycosyltransferase activity	7	endosome	4
fructose 6-phosphate metabolic process	6	mRNA binding	7	mitochondrial inner membrane	4
glycolytic process	6	6-phosphofructokinase activity	6	cytoskeleton	3
protein refolding	6	beta-glucosidase activity	6	endoplasmic reticulum lumen	3
intracellular protein transport	5	calcium ion binding	6	Golgi membrane	3
polysaccharide catabolic process	5	cellulase activity	6	mitochondrial proton-translocating ATP synthas	3
proteolysis	5	structural molecule activity	6	chaperonin-containing T-complex	2
pyruvate metabolic process	5	fructose-bisphosphate aldolase activity	5	endoplasmic reticulum membrane	2
small molecule metabolic process	5	aldose 1-epimerase activity	5	intracellular anatomical structure	2
sucrose metabolic process	5	glycogen (starch) synthase activity	5	lipid droplet	2
gluconeogenesis	4	L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity	5	mitochondrial outer membrane	2
microtubule cytoskeleton organization	4	L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity	5	proteasome regulatory particle, base subcompl	2
plant-type cell wall biogenesis	4	sucrose synthase activity	5	protein-containing complex	2
proteasomal protein catabolic process	4	threonine-type endopeptidase activity	5	cell wall	1
protein import into nucleus	4	4 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosph	4	COPII vesicle coat	1
starch biosynthetic process	4	lipid binding	4	eukaryotic translation initiation factor 3 comple	1
transport	4	4 L-malate dehydrogenase activity	4	mitochondrial matrix	1
ubiquitin-dependent protein catabolic process	4	translation factor activity, RNA binding	4	mitochondrial pyruvate dehydrogenase comple	1
cell division	3	transmembrane transporter activity	4	mitochondrial respiratory chain complex II, suc	1
cell redox homeostasis	3	5-methyltetrahydropteroylglutamate-homocysteine S-meth	3	nuclear envelope	1
cytoplasmic translational elongation	3	acid phosphatase activity	3	nucleolus	1
cytoplasmic translational initiation	3	3 aldehyde dehydrogenase (NAD+) activity	3	nucleoplasm	1
dephosphorylation	3	3 betaine-aldehyde dehydrogenase activity	3	nucleosome	1
generation of precursor metabolites and energy	3	3 L-ascorbate peroxidase activity	3	PCNA complex	1
glucan catabolic process	3	ligase activity	3	peroxisomal matrix	1
methionine biosynthetic process	3	3 nuclear localization sequence binding	3	plant-type vacuole	1
mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport	3	3 phosphatase activity	3	protein phosphatase type 2A complex	1
nucleobase-containing compound catabolic process	3	3 phosphoenolpyruvate carboxylase activity	3	vacuolar membrane	1
plant-type hypersensitive response	3	3 proline-tRNA ligase activity	3		
prolyl-tRNA aminoacylation	3	3 ribonuclease activity	3		
protein targeting	3	3 RNA helicase activity	3		
protein transport	3	3 serine-type endopeptidase inhibitor activity	3		
regulation of transcription, DNA-templated	3	3 superoxide dismutase activity	3		
response to reactive oxygen species	3	3 thioredoxin peroxidase activity	3		
signal transduction	3	3 translation initiation factor activity	3		
sulfur compound metabolic process	3	3 triose-phosphate isomerase activity	3		
trehalose biosynthetic process	3	3 2-isopropylmalate synthase activity	2		
branched-chain amino acid biosynthetic process	2	2 3-beta-hydroxy-delta5-stroid dehydrogenase activity	2		
cell wall organization	2	2 4-alpha-glucanotransferase activity	2		
cellular nitrogen compound metabolic process	2	2 acetyl-CoA C-acyltransferase activity	2		
cellular response to anoxia	2	2 actin filament binding	2		
chromosome organization	2	2 alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity	2		
D-xylose catabolic process	2	2 enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH) activity	2		
fatty acid beta-oxidation	2	2 glutamine-tRNA ligase activity	2		
fatty acid biosynthetic process	2	2 glycine hydroxymethyltransferase activity	2		
glutamyl-tRNA aminoacylation	2	2 glycogen phosphorylase activity	2		
glycogen catabolic process	2	2 manganese ion binding	2		
glycogen metabolic process	2	2 methyltransferase activity	2		
L-serine catabolic process	2	2 pectin acetyl esterase activity	2		
maltose catabolic process	2	2 protein kinase C binding	2		
maturation of LSU-rRNA	2	2 Rab GDP-dissociation inhibitor activity	2		
maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	2	2 sarcosine oxidase activity	2		
mRNA processing	2	2 translation elongation factor activity	2		
negative regulation of catalytic activity	2	2 tRNA binding	2		
negative regulation of endopeptidase activity	2	2 UTglucose-1-phosphate uridylyltransferase activity	2		
NLS-bearing protein import into nucleus	2	2 voltage-gated anion channel activity	2		
phosphorylation	2	2 xylose isomerase activity	2		

positive regulation of protein phosphorylation	2	2-alkenal reductase [NAD(P)+] activity	1
positive regulation of translational fidelity	2	3-isopropylmalate dehydratase activity	1
protein-containing complex assembly	2	acetylornithine deacetylase activity	1
removal of superoxide radicals	2	actin monomer binding	1
response to desiccation	2	adenine phosphoribosyltransferase activity	1
small GTPase mediated signal transduction	2	adenylate kinase activity	1
steroid biosynthetic process	2	alcohol dehydrogenase activity, zinc-dependent	1
translational elongation	2	aminoacyl-tRNA editing activity	1
translational initiation	2	aminopeptidase activity	1
water transport	2	AMP deaminase activity	1
reproduction	1	ATADP antiporter activity	1
acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate	1	catalase activity	1
actin filament depolymerization	1	chromatin binding	1
aromatic compound biosynthetic process	1	dihydrolipoyl dehydrogenase activity	1
cell cycle	1	dihydrolipoysine-residue succinyltransferase activity	1
cellular aldehyde metabolic process	1	dimethylallyltransferase activity	1
cellular amino acid biosynthetic process	1	double-stranded DNA binding	1
cellular response to heat	1	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity	1
cellular response to oxidative stress	1	glutamate 5-kinase activity	1
circadian rhythm	1	glutamate dehydrogenase (NAD+) activity	1
de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process	1	glutamate-ammonia ligase activity	1
defense response	1	glutathione transferase activity	1
endosperm development	1	glycine-tRNA ligase activity	1
ethanol oxidation	1	GTPase activator activity	1
farnesyl diphosphate biosynthetic process	1	hydrolase activity	1
formation of cytoplasmic translation initiation complex	1	inorganic diphosphatase activity	1
glucose catabolic process	1	ketol-acid reductoisomerase activity	1
glutamate catabolic process	1	lactoylglutathione lyase activity	1
glutamine biosynthetic process	1	L-leucine:2-oxoglutarate aminotransferase activity	1
glutathione metabolic process	1	malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity	1
glycine betaine biosynthetic process from choline	1	metalloendopeptidase activity	1
glycosaminoglycan biosynthetic process	1	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating) act	1
hydrogen peroxide catabolic process	1	mRNA 3'-UTR binding	1
IMP salvage	1	NADPH dehydrogenase (quinone) activity	1
inorganic anion transport	1	nuclease activity	1
isoleucine biosynthetic process	1	O-methyltransferase activity	1
leading strand elongation	1	orotate phosphoribosyltransferase activity	1
leucine biosynthetic process	1	peroxidase activity	1
leucyl-tRNA aminoacylation	1	phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) activity	1
L-methionine salvage from methylthioadenosine	1	protein dimerization activity	1
lysyl-tRNA aminoacylation	1	protein disulfide isomerase activity	1
mitochondrial alanyl-tRNA aminoacylation	1	protein serine/threonine kinase activity	1
mitochondrial glycyl-tRNA aminoacylation	1	protein tag	1
mitochondrion organization	1	proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechani	1
negative regulation of translation	1	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity	1
nucleocytoplasmic transport	1	single-stranded DNA binding	1
nucleosome assembly	1	spermidine synthase activity	1
ornithine biosynthetic process	1	succinate dehydrogenase (ubiquinone) activity	1
pentose-phosphate shunt	1	succinate-semialdehyde dehydrogenase (NAD+) activity	1
pentose-phosphate shunt, oxidative branch	1	thiosulfate sulfurtransferase activity	1
phosphate-containing compound metabolic process	1	transaldolase activity	1
photosynthesis	1	transaminase activity	1
polyamine biosynthetic process	1	transferase activity	1
positive regulation of proteasomal protein catabolic process	1	transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than meth	1
positive regulation of RNA polymerase II transcription preinitiation complex assembly	1	transketolase activity	1
proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	1	ubiquitin activating enzyme activity	1
protein dephosphorylation	1	UDP-arabinopyranose mutase activity	1
protein folding in endoplasmic reticulum	1	UDP-glucose 6-dehydrogenase activity	1
protein phosphorylation	1	water channel activity	1
protein ubiquitination	1	zinc ion binding	1
protein transmembrane transport	1	iron ion binding	1
purine nucleotide metabolic process	1		
purine ribonucleoside salvage	1		
regulation of COPII vesicle coating	1		
regulation of gene expression	1		
response to cadmium ion	1		
response to cold	1		
response to heat	1		
response to iron ion	1		
response to oxidative stress	1		
response to water deprivation	1		
ribosomal subunit export from nucleus	1		
rRNA processing	1		
sequestering of actin monomers	1		
thymine catabolic process	1		
transmembrane transport	1		
transsulfuration	1		
vesicle-mediated transport	1		
xylan catabolic process	1		



Victor et al. Supplementary Table S7. Exclusive biological process terms to WWF and RWF groups.

Sample	Biological Process	PC	Percentage
Whole Wheat Flour	anatomical structure development	1	0,2%
	box C/D RNA 3'-end processing	1	0,2%
	cell wall organization or biogenesis	1	0,2%
	nuclear migration	1	0,2%
	pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch	1	0,2%
	response to bacterium	1	0,2%
	ribosome biogenesis	1	0,2%
	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane, translocation	1	0,2%
Refined Wheat Flour	actin filament depolymerization	1	0,2%
	cell cycle	1	0,2%
	cell division	3	0,6%
	cellular amino acid biosynthetic process	1	0,2%
	endosperm development	1	0,2%
	farnesyl diphosphate biosynthetic process	1	0,2%
	formation of cytoplasmic translation initiation complex	1	0,2%
	glutamate catabolic process	1	0,2%
	glutaminyl-tRNA aminoacylation	2	0,4%
	glycine betaine biosynthetic process from choline	1	0,2%
	glycogen catabolic process	2	0,4%
	glycosaminoglycan biosynthetic process	1	0,2%
	inorganic anion transport	1	0,2%
	leucine biosynthetic process	1	0,2%
	leucyl-tRNA aminoacylation	1	0,2%
	L-methionine salvage from methylthioadenosine	1	0,2%
	maltose catabolic process	2	0,4%
	mitochondrial alanyl-tRNA aminoacylation	1	0,2%
	mitochondrial glycyl-tRNA aminoacylation	1	0,2%
	nucleocytoplasmic transport	1	0,2%
	ornithine biosynthetic process	1	0,2%
	pentose-phosphate shunt	1	0,2%
	phosphate-containing compound metabolic process	1	0,2%
	photosynthesis	1	0,2%
	positive regulation of proteasomal protein catabolic process	1	0,2%
	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	1	0,2%
	protein folding in endoplasmic reticulum	1	0,2%
	protein phosphorylation	1	0,2%
	protein-containing complex assembly	2	0,4%
	purine ribonucleoside salvage	1	0,2%
	response to cadmium ion	1	0,2%
	sequestering of actin monomers	1	0,2%
	small GTPase mediated signal transduction	2	0,4%
	steroid biosynthetic process	2	0,4%

	transsulfuration	1	0,2%
	vesicle-mediated transport	1	0,2%
	xylan catabolic process	1	0,2%



Victorio et al. Supplementary Table S8. UP and DOWN-accumulated proteins when compared WWF high GF (A1) / WWF low GF (C1). The following filters were used: maximum CV of 0.3, p-values lower than 0.05 and log2 fold change greater than 0.6 for UP or lower than -0.6 for DOWN.

ACCESSION	DESCRIPTION (OMICSBBOX)	REPORTED PEPTIDES	SEQUENCE COVERAGE	A1 1	A1 2	A1 3	C1 1	C1 2	C1 3	AVE A1	CV A1	AVE C1	CV C1	T-TEST A1/C1	FOLD_CHANGE A1/C1	LOG2 A1/C1	DIFFERENTIAL ACCUMULATION A1/C1	nLog(p)
																	UP	DOWN
Q43691	Trypsin/alpha-amylase inhibitor CMX2	3	22.31	105721	97456	64934	2696	3286	3079	89370	0.2413	3020	0.0900	0.00227	-4.89	UP	2.644093	
A0A3B6SU01	class II chitinase	9	68.42	259153	212036	237132	9673	10175	9746	238107	0.0998	9865	0.0275	0.00098	-4.58	UP	4.114857	
A0A3B6JN50	trypsin/alpha-amylase inhibitor	8	51.06	497069	390788	319009	34689	40097	38274	402589	0.2215	37687	0.0730	0.00210	-3.42	UP	2.678729	
Q9ST57	Serpin-Z2A	16	44.97	206172	113546	154595	10685	17837	19785	158104	0.2396	16102	0.2975	0.00621	-3.30	UP	2.207144	
Q4G92	Gamma gliadin-D4	5	39.60	515770	328671	359079	83396	62094	46999	401473	0.2496	64163	0.2850	0.00458	-2.65	UP	2.339311	
A0A3BSXU15	outer envelope pore protein 16, chloroplastic	6	60.42	76212	49684	46492	13920	15294	15335	57463	0.2839	14849	0.0542	0.01067	-1.95	UP	1.97115	
A0A07TRUW9	early nodulin-like protein 1	2	19.80	30219	33129	30548	8546	9213	6850	31298	0.0509	8203	0.1485	0.00094	-1.93	UP	4.428349	
A0A3B6LW98	protein synthesis inhibitor II-like	6	17.96	29169	20853	20104	6408	6489	5764	23375	0.2152	6220	0.0639	0.00416	-1.91	UP	2.380778	
A0A3B6AS74	ricin B-like lectin RADG2	18	68.22	74662	73301	69043	18411	20810	20299	72365	0.0407	19840	0.0637	0.00001	-1.87	UP	0.537348	
Q41585	Actin protein	2	26.15	58820	59385	40223	15770	19545	13956	52809	0.2065	16423	0.2362	0.00502	-1.69	UP	2.299417	
A0A3B6LT59	late embryogenesis abundant protein D-34	13	78.95	48257	31173	56873	16278	15149	12880	45434	0.2879	14769	0.1172	0.01579	-1.62	UP	1.801545	
A0A3B6TN66	17.4 kDa class I heat shock protein-like	7	53.13	75564	53736	65126	20911	22873	22157	64809	0.1688	21913	0.0413	0.00247	-1.56	UP	2.607742	
A0A3B6PJ03	phosphoglycerate kinase, cytosolic	24	76.80	114346	100968	120067	37549	41480	37805	114794	0.1224	38945	0.0565	0.00076	-1.56	UP	3.117652	
A0A3B6SO43	basic endochitinase A	8	51.26	31213	340297	225834	99408	104350	109770	202765	0.2037	104509	0.0496	0.00552	-1.49	UP	2.258035	
A0A1DSUJB33	avena alpha amylase trypsin inhibitor-2	4	26.15	32241	27086	23727	8430	10426	11911	27685	0.1549	10256	0.1704	0.00286	-1.43	UP	2.543924	
A0A3B6NC55	romal 70 kDa heat-shock-related protein, chloroplast	2	4.46	20250	19220	18718	7018	7801	6816	19390	0.0403	7212	0.0721	0.00002	-1.43	UP	4.637482	
A0A3B6NC44	Alcohol dehydrogenase ADH4	15	57.56	132013	128110	118610	49959	52170	51213	126244	0.0546	51114	0.0217	0.00096	-1.30	UP	4.317164	
A0A3B6EG19	aspartic proteinase czetain-1-like isoform X1	15	39.15	284151	282654	213046	100075	94938	96572	232624	0.2183	96962	0.0282	0.00987	-1.26	UP	2.05471	
A0A3B6TN24	60S acidic ribosomal P3	3	49.17	29975	29021	30856	13644	11853	15868	32951	0.1821	13788	0.1459	0.00632	-1.26	UP	2.199511	
A0A3B6PN44	limit dextrinase inhibitor	5	42.21	21373	19803	16924	9694	8473	6525	19367	0.1165	3231	0.1942	0.00222	-1.23	UP	2.653403	
A0A3B6ED63	WHy domain-containing protein	7	66.89	75138	83790	98440	38483	37525	35516	85789	0.1373	37084	0.0402	0.00207	-1.21	UP	6.684394	
I0T65	alpha-gliadin storage protein	3	25.89	366391	267393	275726	127712	116251	156702	303170	0.1811	133555	0.1561	0.00748	-1.18	UP	2.126071	
A0A3B6GW42	aspartic protease czetain-1-like isoform X1	15	37.79	5006	4130	5205	2149	2097	2080	4781	0.1196	2109	0.0170	0.01028	-1.18	UP	6.853921	
A0A3B6TSN8	can-braching enzyme, chloroplastic/amyloplastic-I	3	4.81	43501	30514	54400	22337	18100	17719	42805	0.2794	10385	0.1322	0.00247	-1.14	UP	1.530654	
A0A1D6RE03	universal stress protein PHOS32-like	6	50.00	116201	94340	67656	40132	42023	43153	02368	0.2586	42696	0.0400	0.03109	-1.13	UP	1.686445	
A0A3B6IN12	Alcohol dehydrogenase 3	5	18.35	28661	26719	28320	12771	13405	12466	27900	0.0372	12881	0.0372	0.00002	-1.12	UP	4.657275	
A0A3B6LH2	heat shock cognate 70 kDa protein 2-like	8	14.67	118290	88623	106759	53179	41191	54204	104557	0.1430	49625	0.1461	0.00457	-1.08	UP	2.33698	
A0A1DSUJ14	desiccation-related protein PC13-62-like	7	34.38	37109	32191	32628	17571	15807	15394	33976	0.0801	16257	0.0711	0.00049	-1.06	UP	3.312503	
A0A3B6IS19	17.9 kDa class I heat shock protein	6	36.31	98748	73585	71100	40505	38352	38433	81144	0.1886	39097	0.0312	0.00090	-1.05	UP	2.054984	
A0A3B6SL3M	1,4-alpha-glucan branching enzyme	21	38.60	63498	51047	66194	27175	32545	27526	60247	0.1341	29982	0.1033	0.00332	-1.05	UP	2.479106	
Q6RU9J	glutamine synthetase cytosolic isoform 1-3	5	26.80	44813	36650	36719	18262	11904	39394	0.1911	19767	0.0729	0.00228	-0.99	UP	2.613474		
A0A1V03	Serpin-Z1A	11	44.47	20636	16759	18830	9408	9833	9940	18742	0.1035	9727	0.0282	0.00195	-0.95	UP	2.771107	
A0A3B6IT56	purple acid phosphatase 3	5	14.63	44093	40448	32007	20799	21696	18834	30183	0.1442	20443	0.0716	0.00612	-0.94	UP	2.700826	
P32023	Alpha-2-purinothione	6	45.59	370156	317165	210528	146457	173691	150275	209283	0.2717	156834	0.0938	0.00409	-0.93	UP	1.352638	
A0A3B6REV7	succinate synthase	32	46.41	289485	195322	252051	117001	133690	138452	245919	0.1830	129715	0.0868	0.01465	-0.92	UP	1.837096	
Q9KG83	1,4-alpha-glucan branching enzyme	22	37.53	216702	70509	74546	33533	41329	38939	71129	0.1622	57334	0.1053	0.00016	-0.91	UP	3.805038	
A0A3B6PZ18	stem 28 kDa glycoprotein-like	6	40.65	48277	40432	53374	25253	26456	247116	47361	0.1377	52475	0.0350	0.00459	-0.89	UP	2.364458	
A0A3B5ZP92	endosperm transcript specific PR60 precursor	5	44.45	137540	108839	133741	63618	66854	70109	126707	0.1230	69794	0.1176	0.00501	-0.86	UP	2.302031	
A0A3B6BK8K	23.2 kDa heat shock protein-like	9	47.95	144154	132002	110690	75524	86516	86714	128949	0.1314	71252	0.0526	0.00451	-0.86	UP	2.346115	
A0A3B6AV4	Tubulin alpha-1 chain	8	20.79	31869	42232	32619	16737	18476	27544	37673	0.1281	20919	0.2774	0.01838	-0.85	UP	1.756682	
D2LNUW	outer envelope protein 16.2, chloroplastic-like	5	30.31	104038	86748	73482	44322	57519	57519	86389	0.1787	50598	0.1368	0.00879	-0.80	UP	1.724463	
A0A3B6UD25	C58_alpha gladiin	15	35.29	462033	471342	492185	264792	235782	324968	475187	0.0325	275181	0.1653	0.01096	-0.79	UP	2.707583	
A0A3B6WKW8	outer envelope protein 16.2, chloroplastic-like	4	28.32	205879	170191	144166	88162	114388	90307	173412	0.1787	10019	0.1308	0.02003	-0.79	UP	1.686411	
A0A3B5ZC21	Chitinase 2	7	45.67	22058	24917	19679	12575	13062	12622	2217	0.180	12666	0.0272	0.00375	-0.78	UP	2.424537	
A0A3B6ZC14	ATP synthase subunit alpha1, mitochondrial	17	57.36	74005	640154	207550	1320135	161359	161359	226863	0.1029	744941	0.1912	0.00944	-0.77	UP	2.024813	
A0A3B6K4M0	Mannose enzyme	2	12.20	1181114	1381659	1320135	9139	8690	9695	216707	0.144208	225572	0.0428	0.01018	-0.75	UP	1.206185	
A0A3B6BZ26	L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic	9	44.44	6705	5207	5947	6148	6963	8573	5983	0.1176	8105	0.0962	0.00342	-0.74	UP	2.375588	
A0A3B6ML14	ATP synthase subunit alpha1, mitochondrial	10	36.40	1992	2642	2642	3734	3971	3607	2480	0.1735	3777	0.0465	0.00844	-0.71	UP	3.496434	
A0A1D6C087	spindelmin synthase	3	14.51	73775	11900	21307	24068	26014	24512	16757	0.2791	25730	0.1039	0.04932	-0.61	UP	1.300583	
A0A3B6B9G7	lipoxygenase-1	6	23.76	8045	7234	11058	12689	8066	8052	14045	0.0996	80599	0.0591	0.01319	-0.60	UP	1.879728	
A0A2U3JD37	Delta gladiin-b1	6	45.68	347788	343770	382593	667327	555692	568544	358050	0.0596	63321	0.0167	0.00069	-0.60	UP	4.031163	
A0A3B6YJ0A	alcohol dehydrogenase ADH1A	17	60.69	81464	79056	79164	180331	18344	18344	129306	0.0546	122806	0.0217	0.001010	-0.60	DOWN	3.966906	
A0A3B6GS26	SERPIN domain-containing protein	2	4.33	50102	45210	81708	220993	366322	353127	390113	19565	0.1114	36984	0.0507	0.00047	-0.60	DOWN	2.996116



Victor et al. Supplementary Table S9. UP and DOWN-accumulated proteins when compared RWF high GF (A2) / RWF low GF (C2). The following filters were used: maximum CV of 0.3, p-values lower than 0.05 and log2 fold change greater than 0.6 for UP or lower than -0.6 for DOWN.

ACCESSION	DESCRIPTION (OMICSBOX)	REPORTED PEPTIDES	SEQUENCE COVERAGE	A2 1	A2 2	A2 3	C2 1	C2 2	C2 3	AVE A2	CV A2	AVE C2	CV C2	T-TEST A2/C2	LOG2 A2/C2	DIF ACCUM A2/C2	
A0A3B6KR02	serpin-ZX	3	14.79	63643	59622	55969	8801	9168	7700	59745	0.64	8556	0.89	0.000002	2.80	UP	
A0A3B6JN50	trypsin/alpha-amylase inhibitor	13	64.54	235630	241312	244092	47208	47238	48069	240345	0.018	47505	0.10	0.000000	2.34	UP	
Q93968	Late embryogenesis abundant protein, group 3	2	16.96	2350510	235152	224460	46776	46686	49659	231542	0.026	47708	0.035	0.000000	2.28	UP	
P24296	Serpin-Z2A	16	51.51	335212	33152	388505	75029	92828	84308	34625	0.029	9850	0.10	0.000021	2.04	UP	
Q93757	Non-specific lipid transfer protein 1	3	29.20	202691	18691	146795	52240	45200	30709	1.63	48518	0.107	0.000000	1.49	UP		
A0A3B6B2T3	alpha-emydrolipase inhibitor	13	63.96	12176	15002	16914	3980	4093	4173	14697	0.162	4082	0.024	0.000013	1.85	UP	
A0A3B6PT84	putative acotinase hydrolase, cytoplasmic	16	25.69	194037	194481	203330	51397	62199	55791	108282	0.035	56459	0.096	0.000001	1.81	UP	
A0A3B6DB70	elongation factor 1-beta	11	67.89	112088	98402	95655	28754	31317	30730	102048	0.086	30874	0.071	0.000017	1.72	UP	
A0A3B6TH76	chitinase 1	5	19.16	35230	33189	38113	12107	10558	10223	35510	0.070	10963	0.092	0.000009	1.70	UP	
A0A3B5Y1F9	Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic	42	61.66	34850	36524	37122	11609	11647	11808	36165	0.033	11688	0.009	0.000000	1.63	UP	
A0A3B5XT99	gamma-gliadin	2	7.91	793372	710233	687653	331022	181224	25545	730419	0.076	254901	0.294	0.000091	1.52	UP	
P04848	HMW glutenin subunit	16	27.27	89932	92728	72993	32422	28531	28505	85218	0.125	29820	0.076	0.000092	1.51	UP	
I6QF63	16.9 kDa class I heat shock protein 1-like	6	56.29	40653	40007	54778	12128	16857	19585	47546	0.185	16190	0.233	0.000542	1.48	UP	
A0A3B6KG00	thiamin-binding protein TLP3	2	15.19	59962	58024	54097	15965	19703	26357	57361	0.052	20586	0.262	0.000049	1.48	UP	
AA5441	Avenin-like b4	7	41.90	73379	59523	64688	22851	26721	29788	56863	0.106	26454	0.131	0.000095	1.32	UP	
A0A3B6SU01	class II chitinase	12	67.67	96905	103397	98757	40756	39191	43486	99688	0.034	41144	0.053	0.000001	1.28	UP	
A0A3B6ED63	late embryogenesis abundant protein Lea14-A	4	37.75	47289	64607	57528	20777	25044	24228	56475	0.154	23350	0.097	0.000310	1.27	UP	
A0A3B6PT46	dehydron 4	2	13.97	39598	31452	29559	11644	16351	14673	33536	0.159	14163	0.175	0.00467	1.24	UP	
A0A3B6SL3M	starch branching enzyme I	34	58.15	13775	135518	130678	52048	58371	61336	134657	0.027	57522	0.083	0.000002	1.23	UP	
A0A3B6PZ54	nucleoside diphosphate kinase 3-like	3	20.37	50136	50136	50136	12215	12215	50136	50136	0.123	50136	0.006	0.000003	1.23	UP	
Q94C92	dehydrin	5	39.60	53074	50136	56852	17998	325726	328883	576748	0.070	268235	0.297	0.000047	1.22	UP	
A0A3B6ISJ9	17.9 kDa class I heat shock protein 1-like	6	41.40	72324	75699	71925	32883	36589	36589	7316	0.038	32570	0.081	0.000003	1.15	UP	
A0A4D5UX7	cysteine proteinase inhibitor 8	4	44.72	42705	34443	29470	13093	20389	15745	35533	0.188	16409	0.225	0.001220	1.11	UP	
Q5D086	Type-5 trionin	5	64.89	66330	53342	59872	35355	28616	21928	59849	0.109	28626	0.234	0.000441	1.06	UP	
A0A3B6D5E7	xylanase inhibitor protein 1-like	8	35.81	22227	30098	32911	9684	17118	16969	30409	0.077	14590	0.291	0.000480	1.06	UP	
A0A4C4BKHS	eukaryotic initiation factor 4A	24	64.98	11643	12294	126053	56172	63645	62994	121596	0.040	60937	0.068	0.000008	1.00	UP	
A0A3B6BT59	antimicrobial peptides-like	3	11.61	30943	25424	28191	11741	15065	13144	26419	0.156	13137	0.125	0.000694	0.99	UP	
A0A3B5Z4D7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	20	68.68	49684	52778	55081	27922	29712	23794	52516	0.052	27063	0.111	0.000040	0.96	UP	
A0A3B6QP79	cobble voltage-gated potassium channel subunit br	2	10.06	15082	15745	14887	9743	6982	6937	15238	0.030	7887	0.204	0.00159	0.95	UP	
A0A3B6RCB1	starch synthase II	7	13.44	18319	20735	22343	10584	10133	11278	20465	0.099	10655	0.054	0.000129	0.94	UP	
P16851	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2	6	54.48	358942	31792	28474	18317	18092	13163	317360	0.126	16548	0.177	0.000603	0.94	UP	
D3KVP3	purple acid phosphatase 3	8	28.66	31059	34580	34585	16810	16184	20178	33408	0.061	17724	0.121	0.000078	0.91	UP	
A0A077RTG8	Malate dehydrogenase, mitochondrial	8	54.71	39994	45677	45245	22978	23899	43639	0.073	23159	0.029	0.000039	0.91	UP		
A0A3B5Y64	solabactam monooxygenase-like	3	8.53	19841	20633	21112	11701	9839	11400	20605	0.003	10980	0.091	0.000016	0.91	UP	
A0A3B6P198	predicted protein	11	22.11	8556	9362	9166	4219	4419	4816	9029	0.048	4850	0.080	0.000024	0.90	UP	
A0A3B6J2C1	alcohol dehydrogenase-like 2	43	57.49	60115	58592	59045	35443	35443	58630	59004	0.084	59649	0.043	0.000001	0.89	UP	
A0A1D5UJ09	trypsin inhibitor TU01	10	51.10	59535	59301	20432	32920	32920	31386	59385	0.002	32186	0.047	0.000001	0.88	UP	
A0A3B6TN62	17.4 kDa class I heat shock protein-like	5	46.25	54973	51625	53222	27527	32287	26895	53296	0.031	28093	0.102	0.000024	0.88	UP	
A0A3B6MV61	2-alkenal reductase (NADP+-dependent)	9	46.36	66504	65189	66588	34437	37494	37222	66837	0.024	36551	0.046	0.000002	0.88	UP	
A0A3B6J2C1	trypsin inhibitor TU01	43	57.49	45147	46484	48939	25690	29681	23049	44510	0.110	26230	0.127	0.000081	0.82	UP	
A0A3B6ZL19	desiccation-related protein PCC13-62-like	10	51.10	6050	59301	52043	32920	32920	30338	18101	0.138	30511	0.029	0.001536	0.80	UP	
A0A3B6TM62	60S ribosomal protein L1	37	63.67	182024	262381	28477	12734	13481	18280	27541	0.075	42765	0.102	0.000218	0.79	UP	
P16319	Glutelin, low molecular weight subunit PTDUC1	3	22.93	43491	50591	34212	22739	23763	27541	32170	0.027	32226	0.173	0.000227	0.79	UP	
A0A3B6JH00	Glutelin, high molecular weight subunit PTDUC1	3	25.06	454089	43264	42634	210306	252168	29792	47808	0.025	253422	0.173	0.000001	0.75	UP	
A0A3B6EN71	60S ribosomal protein L1	3	51.14	80571	80569	80569	49491	49491	94500	94500	0.049	94500	0.073	0.000503	0.79	UP	
A0A3B6JG00	endopeptidase cell-specific PCC6 precursor	7	53.27	167346	137097	11977	70934	10323	31722	31724	0.027	32403	0.121	0.000001	0.78	UP	
A0A3B6SGJ8	de hydrogenase 2	32	50.31	15504	13861	17630	6206	8011	9145	15988	0.117	9119	0.021	0.000507	0.77	UP	
W5F826	proteasome subunit beta type-1	3	33.03	47926	43588	39014	26684	26684	24245	43268	0.155	25318	0.099	0.000507	0.77	UP	
A0A3B6MKV8	outer envelope protein 16-2, chloroplastic-like	2	11.58	162328	17248	185448	101640	97662	109168	17478	0.067	10270	0.057	0.000068	0.77	UP	
P82000	type 2 non-specific lipid transfer protein precursor	4	65.63	49147	46484	39389	25690	29681	23049	44510	0.110	26230	0.127	0.000019	0.76	UP	
A0A3B6JU77	late embryogenesis abundant protein 1	4	21.88	39275	36110	42371	21300	24248	23969	39252	0.080	23172	0.070	0.000039	0.76	UP	
A0A3B6JH27	sulfatase	2	11.24	37272	36136	36449	12424	7275	67575	7424	11513	0.113	7095	0.064	0.000510	0.70	UP
A0A3B6JH48	trypsin inhibitor 2	4	47.35	97415	94947	93644	35280	36074	36207	61586	0.036	36500	0.064	0.000081	0.70	UP	
A0A3B6SD73	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	27	68.09	64524	68783	69372	105381	10067	11045	67658	0.038	105324	0.059	0.000041	0.68	UP	
A0A3B6IM60	farnin protein	6	34.93	35869	32369	33724	53581	58570	46588	32484	0.040	5313	0.116	0.000835	0.64	UP	
A0A7754QD0	SS DRBM domain-containing protein	6	26.26	12664	20409	19434	27474	24096	2928	17805	0.024	2777	0.116	0.000840	0.67	UP	
Q6RUU0	glutamine synthetase cytosolic 1-3	9	38.67	79390	73277	80095	117042	11629	131190	77554	0.026	12106	0.069	0.000116	0.67	UP	
Q41933	Serpin-Z1A	23	83.67	53485	55331	68685	72777	113422	99178	59161	0.140	69292	0.195	0.003491	-0.70	DOWN	
A0A3B6H2L20	cationic peroxidase SP4C-like	6	23.56	5238	5532	4546	8344	8704	8106	5105	0.099	8356	0.036	0.00065	-0.72	DOWN	
A0A3B6LMW5	Formyltransferolipoflate synthetase	18	36.66	21956	23574	23261	37261	40971	41062	23518	0.065	36756	0.055	0.000045	-0.76	DOWN	
A0A3B6KM6Q	beta-glucosidase BoGH3B-like	6	15.71	5618</td													



Victorio et al. Supplementary Table S10. UP and DOWN-accumulated proteins when compared RWF hard NILs (384) / RWF soft NILs (389). The following filters were used: maximum CV of 0.3, p-values lower than 0.05 and log2 fold change greater than 0.6 for UP or lower than -0.6 for DOWN.

ACCESSION	DESCRIPTION (OMICSBOX)	REPORTED PEPTIDES	SEQUENCE COVERAGE	384 1	384 2	384 3	389 1	389 2	389 3	AVE 384	CV 384	AVE 389	CV 389	T-TEST 384/389	LOG2 384/389	DIF ACCUM 384/389
P29546	elongation factor 1-beta	11	62.04	88402	93928	99046	5022	3997	3062	93792	0.057	4027	0.243	0.00001	4.54	UP
AOA3B6D870	elongation factor 1-beta	11	67.89	55198	58649	61844	24695	19654	15057	58564	0.057	19802	0.243	0.00033	1.56	UP
AOA3B5Y2ZB	heat shock 70 kDa protein 4	35	68.08	63691	88633	80630	36206	32849	32066	77651	0.164	33707	0.065	0.00416	1.20	UP
AOA3B6N0L6	ribonuclease TUDOR 1	18	25.40	33820	43338	42923	19837	22032	26386	40027	0.134	22752	0.146	0.00912	0.81	UP
AOA3B6QEZ5	phosphoglycerate kinase, cytosolic	26	77.56	300766	305333	317884	182490	183425	161973	307994	0.029	175963	0.069	0.00011	0.81	UP
AOA1D5WW00	16.9 kDa class I heat shock protein 1-like	6	56.95	22764	19195	20935	11718	14525	10563	20963	0.085	12269	0.166	0.00512	0.77	UP
AOA3B6SD73	iDP-glucose pyrophosphorylase small subunit	27	68.08	167522	184370	182917	112908	102040	100243	178270	0.052	105064	0.065	0.00040	0.76	UP
AOA3B6R7B8	avenin-like b1	5	52.23	92269	66517	78012	57998	34624	47734	78933	0.163	46785	0.250	0.03305	0.75	UP
AOA3B6N0S7	protein synthesis inhibitor II-like	7	21.33	65172	73732	71320	29165	53865	43911	70075	0.063	42314	0.294	0.02185	0.73	UP
AOA3B6EHG7	cytosolic isocitrate dehydrogenase [NADP] ⁺	19	66.01	30582	28273	40736	20005	20524	19834	33197	0.203	20121	0.018	0.02701	0.72	UP
W5C5U5	40S ribosomal protein S9-2	6	25.13	26526	34720	37171	22291	21308	16055	32806	0.170	19885	0.169	0.02629	0.72	UP
AOA3B6H2L0	cationic peroxidase SPC4-like	6	23.56	9040	11590	10238	6319	5996	6800	10289	0.124	6375	0.064	0.00717	0.69	UP
AOA0CAK1H5	eukaryotic initiation factor 4A	24	64.98	152239	143863	164083	97033	109252	80010	153395	0.068	95432	0.154	0.00492	0.68	UP
AOA3B5Y1W9	pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplast	38	59.27	66785	66722	71077	47662	38966	41044	68195	0.037	42554	0.107	0.00102	0.68	UP
AOA3B6FY81	nc finger CCH domain-containing protein 1	6	24.40	35594	32579	35895	29497	19166	17800	34689	0.053	22154	0.289	0.03099	0.65	UP
AOA3B6GXH6	aspartic proteinase chymotrypsin-like isoform X'	16	36.52	119915	95078	101002	77884	66763	60272	105331	0.123	68307	0.130	0.01516	0.62	UP
AOA3B6DKG2	Nucleoredoxin	12	32.24	41111	33406	29872	17836	25688	24211	34796	0.165	22578	0.185	0.04075	0.62	UP
AOA3B6PUC2	betaine aldehyde dehydrogenase	21	74.44	20149	19026	19056	28681	31355	28314	19410	0.033	29450	0.056	0.00061	-0.60	DOWN
AOA3B6TM00	protein virilizer homolog	3	3.97	19470	11351	20626	26328	28642	27441	17149	0.295	27470	0.042	0.02612	-0.68	DOWN
AS4AL5	Avenin-like b4	7	41.90	28027	27362	28895	42854	45088	50433	28095	0.027	46125	0.084	0.00141	-0.72	DOWN
AOA3B6JCE1	ribonuclease TUDOR 1	43	57.49	57585	62327	59805	110764	105237	100218	59906	0.040	105406	0.050	0.00017	-0.82	DOWN
AOA3B6SDG4	serpin 2	8	30.77	20352	19665	21554	34775	43373	34683	20524	0.047	37610	0.133	0.00443	-0.87	DOWN
AOA077S3V2	aspartate aminotransferase, cytoplasmic	26	67.40	22517	24073	22775	48369	47153	48996	23122	0.038	48173	0.019	0.00000	-1.06	DOWN
Q9XGB3	starch branching enzyme I	47	58.02	10437	12381	11549	22722	26928	24934	11456	0.085	24861	0.085	0.00056	-1.12	DOWN
AOA3B6C068	Vacuolar sorting receptor 1	21	42.25	66213	51751	49237	87053	139036	140994	55734	0.164	122361	0.250	0.02249	-1.13	DOWN
AOA3B5ZW3	Chitinase 2	9	55.71	5215	4273	3449	12727	10532	7836	4312	0.205	10365	0.236	0.01579	-1.27	DOWN