



Universidade de Brasília

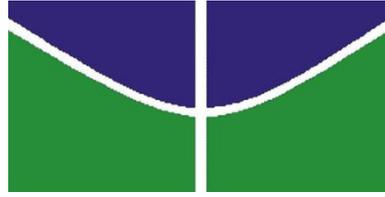
Instituto de Biologia

Departamento de Pós Graduação em Botânica

Análise proteômica de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) em resposta ao  
alumínio

**Natália Faustino Cury**

**Brasília-DF  
2017**



Universidade de Brasília  
Instituto de Biologia  
Departamento de Pós Graduação em Botânica

Análise proteômica de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) em  
resposta ao alumínio

**Natália Faustino Cury**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora.

**Brasília-DF  
2017**

*A Deus, que me guiou e me sustentou até aqui, dedico.*

## **Agradecimentos**

Meu primeiro agradecimento é a Deus, pois sem Ele não teria chegado até aqui.

Aos meus pais pela educação e demais familiares pela compreensão dos momentos de ausência.

Ao meu esposo Davi pelo carinho e orações.

Às amigas Lecir, Paula e Sineide pelas orações e torcida.

Ao meu orientador Luiz pela confiança, ajuda e expectativa na finalização positiva deste trabalho.

Aos professores Wagner Fontes, Carlos André Richart e Marcelo Valle pela parceria e sugestões na execução das análises proteômicas.

Ao pessoal do departamento de Botânica em especial o Fábio Nakamura, Michelle Fayad, Marcelo, João Pedro pela torcida, conversas e ajudas indescritíveis.

À equipe do LBQP da UnB em especial aos técnicos e colegas Jaques e Nuno pela colaboração e paciência.

Ao Mendes e Vando pela ajuda nas coletas de campo.

Aos professores do departamento de Botânica - UnB, em especial a coordenadora Cássia Munhoz e Paulo Câmara pelo auxílio na solução dos problemas burocráticos e/ou de suportes financeiros.

A todos que porventura não tenham sido mencionados mas colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho que passou por tantos momentos difíceis, meus sinceros agradecimentos.

“Aqueles que confiam no Senhor são como o monte de Sião, que não se abala, mas permanece para sempre” (Salmos 125:1).

“De todos os lados somos pressionados, mas não desanimados; ficamos perplexos, mas não desesperados; somos perseguidos, mas não abandonados; abatidos, mas não destruídos” (2 Coríntios 4: 8-9).

“Ainda que a minha mente e o meu corpo enfraqueçam, Deus é a minha força, ele é tudo o que eu sempre preciso” (Salmos 73:26).

“Mas aqueles que esperam no SENHOR renovam suas forças. Voam alto como águias; correm e não se fatigam, caminham e não se cansam” (Isaías 40:31).

“Vinde a mim, todos os que estais cansados e oprimidos, e eu vos aliviarei”  
(Mateus 11:28).

## RESUMO

A presença do alumínio trivalente ( $Al^{3+}$ ) em solos ácidos representa um dos principais problemas para o desenvolvimento de cultivares em todo o mundo. Contudo, essa é uma característica comum nos solos do Cerrado. Além disso, no Cerrado existem muitas espécies que, além de não sofrer com a presença do Al, podem acumular grandes quantidades desse metal. Um exemplo desse tipo de plantas é a *Qualea grandiflora*, que se destaca por ser uma das espécies acumuladoras mais abundantes do Cerrado e pode acumular até 5 g de  $Al.Kg^{-1}$  em matéria seca. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são pouco conhecidos. Assim, uma análise proteômica foi utilizada no presente estudo com o objetivo de identificar e quantificar proteínas responsivas ao Al, no intuito de fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos em resposta a este metal. Para isso, plantas de *Q. grandiflora* foram crescidas com Al ou sem (controle) durante um período de 90 dias. Subsequentemente, proteínas totais foram extraídas a partir de raízes das plantas de cada condição e, em seguida, analisadas por meio de técnicas proteômicas sem marcação (*label free*) associadas à cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas do tipo LTQ-Orbitrap Elite (LC-MS/MS). O presente estudo identificou um total de 2520 proteínas, dentre as quais 410 foram diferencialmente abundantes em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao Al (274 reguladas positivamente e 136 reguladas negativamente). Essas proteínas diferencialmente abundantes foram associadas a diversos processos biológicos, bem como muitas vias metabólicas. Os principais processos biológicos foram relacionados a processos de oxirredução, metabolismo de carboidrato, catabolismo de substâncias orgânicas entre outros. Além disso, o Al desempenhou papéis ativos na regulação de vias de sinalização relacionadas ao metabolismo de glioxilato, fosforilação oxidativa, degradação de ácidos graxos, metabolismo nucleotídico, atividade ribossomal e metabolismo de aminoácidos. Adicionalmente, os resultados obtidos fornecem um extenso conjunto de dados de proteínas reguladas pelo Al em plantas de *Q. grandiflora*, que podem ajudar a elucidar os mecanismos do metabolismo em resposta ao Al nesta planta nativa acumuladora. Além disso, as informações aqui reunidas abrem a possibilidade de produzir plantas cultivadas mais tolerantes ao Al por meio de eventuais novas proteínas e genes que podem ser encontrados nesta planta.

**Palavras chave:** *Q. grandiflora*, resposta ao Al, proteoma, *label free*, LC-MS/MS, vias sinalizadas pelo Al.

## ABSTRACT

The presence of trivalent aluminum ( $\text{Al}^{3+}$ ) in acid soils represents one of the main hindrances for crops around the world. Nevertheless, this is a regular feature in Cerrado soils. Moreover, in Cerrado there are many species that, besides not resenting Al presence, can accumulate large amounts of this metal. An example is *Qualea grandiflora*, which stands out as one of the most abundant Al-accumulating species of Cerrado and may accumulate up to 5 g of  $\text{Al.Kg}^{-1}$  of dry matter. However, the mechanisms involved in this process are still poorly known. Thus, a proteomic analysis was used in the present study with the objective of identifying and quantifying responsive proteins to Al, in order to provide a better understanding of the molecular mechanisms involved in response to this metal. Hence, *Q. grandiflora* plants were grown with Al or without (control) during a period of 90 days. Subsequently, total proteins were extracted from roots of plants from each treatment and then analyzed by using label-free techniques associated with liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap Elite type mass spectrometer (LC-MS/MS). The present study identified a total of 2,520 proteins, of which 410 were differentially abundant in *Q. grandiflora* roots in response to Al (274 upregulated and 136 downregulated). These differentially abundant proteins were associated with several biological processes, as well as with many metabolic pathways. The main biological processes were related to oxidation-reduction processes, carbohydrate metabolism, catabolism of organic substances among others. In addition, Al has played active role in regulating signaling pathways related to the metabolism of glyoxylate, oxidative phosphorylation, fatty acid degradation, nucleotide metabolism, ribosomal activity, and amino acid metabolism. Thus, the results obtained provide an extensive dataset of proteins regulated by Al in *Q. grandiflora* plants, which may help to elucidate the mechanisms of Al metabolism in this native accumulating plant. Moreover, the information gathered here opens the possibility of producing more Al-tolerant crop plants through eventual novel proteins and genes that may be found in this plant.

**Key words:** *Q. grandiflora*, Al response, proteome, label free, LC-MS/MS, Al signaling pathways.

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
2. <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1. Presença de Al nos solos.....	14
2.2. O Cerrado.....	15
2.3. Efeito do Al em plantas: aspectos fisiológicos e bioquímicos.....	17
2.4. Mecanismos de resistência/tolerância ao Al.....	18
2.5. Plantas acumuladoras de Al.....	20
2.6. Vochysiaceae.....	21
2.7. <i>Qualea grandiflora</i> (Mart.).....	21
2.8. Proteômica de plantas.....	23
2.8.1. Proteômica descritiva.....	23
2.8.2. Proteômica quantitativa .....	25
2.8.3. Técnicas proteômicas <i>label free</i> (sem marcação).....	26
2.9. Proteínas reguladas em plantas em resposta ao Al.....	27
2.10. Plantas transgênicas conferindo maior tolerância ao Al.....	28
3. <b>JUSTIFICATIVA</b> .....	30
4. <b>OBJETIVO GERAL</b> .....	31
4.1. Objetivos específicos.....	31
5. <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
5.1. Material vegetal.....	33
5.2. Crescimento das plantas e tratamento com Al.....	33
5.3. Extração e quantificação de proteínas para análise LC-MS/MS .....	34
5.4. Eletroforese unidimensional.....	34
5.5. Digestão proteica para análise LC-MS/MS .....	34
5.6. Análise dos peptídeos por nano-LC-MS/MS.....	35
5.7. Identificação e quantificação das proteínas.....	36
5.8. Análises estatísticas.....	37
5.9. Análise de ontologia gênica (GO).....	37
5.10. Análise de vias metabólicas.....	37
5.11. Análise das interações proteicas.....	38
6. <b>RESULTADOS</b> .....	38

6.1. Germinação e desenvolvimento das plantas.....	38
6.2. Efeito do Al no desenvolvimento das plantas de <i>Q. grandiflora</i> .....	39
6.3. Quantificação e análise qualitativa das proteínas.....	40
6.4. Identificação e análise qualitativa das proteínas de raízes de <i>Q. grandiflora</i> .....	41
6.5. Análises estatísticas.....	41
6.6. Proteínas diferencialmente abundantes em raízes de <i>Q. grandiflora</i> .....	43
6.7. Ontologia gênica de proteínas responsivas ao Al.....	43
6.8. Vias metabólicas responsivas ao Al.....	44
6.9. Interações entre as proteínas diferencialmente reguladas.....	46
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
7.1. Al foi benéfico para o crescimento e desenvolvimento de <i>Q. grandiflora</i> .....	47
7.2. Suplementação de Al promoveu o crescimento de raízes de <i>Q. grandiflora</i> .....	47
7.3. Proteínas da parede celular foram induzidas em resposta ao Al.....	49
7.4. Proteínas diferencialmente abundantes responsivas ao Al em raízes de <i>Q. grandiflora</i> estão associadas a diversos processos biológicos.....	50
7.4.1. Abundância de enzimas relacionadas à capacidade oxirredutora em raízes de <i>Q. grandiflora</i> suplementadas com Al.....	52
7.5. O Al atuou diretamente no metabolismo primário de plantas de <i>Q. grandiflora</i> .....	54
7.5.1. Al regulou o metabolismo de ácidos orgânicos de <i>Q. grandiflora</i> .....	55
7.5.2. A abundância de enzimas associadas à degradação de ácidos graxos foi alterada em raízes de <i>Q. grandiflora</i> na presença de Al.....	57
7.5.3. Metabolismo de nucleotídeos e aminoácidos em resposta ao Al.....	58
7.5.4. Atividade ribossomal.....	59
7.5.5. Fosforilação oxidativa.....	60
7.6. Análise de interações proteicas revelam duas principais interações em resposta ao Al em raízes de <i>Q. grandiflora</i> .....	61
<b>8. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>63</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>65</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE ABREVIACOES

ACO - aconitase

Al - alumínio

Al<sup>3+</sup> - alumínio trivalente

AlCl<sub>3</sub> - cloreto de alumínio

ATP - adenosina trifosfato

DDA - aquisio dependente de dados

DLAT - dihidrolipoamido acetiltransferase

DLD - dihidrolipoamido desidrogenase

DLST - dihidrolipoamido succiniltransferase

FDH - formato desidrogenase

HCD - *High-energy collision dissociation*

IDH - isocitrato desidrogenase

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KO - KEGG Orthology (ortologia KEGG)

KOALA - *KEGG Orthology and Links Annotation*

LC - *liquid chromatography* (cromatografia líquida)

LSC - succinil-CoA sintetase subunidade alfa

MDH - malato desidrogenase

MS - *mass spectrometry* (espectrometria de massa)

MS - Murashige & Skoog

m/z - razão da massa sobre a carga

PAGE - *polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

PCA - *principal component analysis* (análise de componentes principais)

PDHB - piruvato desidrogenase componente E1 subunidade beta

STRING - *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*

TCA - *citric acid cycle* (ciclo do ácido cítrico)

TFA - cido trifluoracético

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Os solos ácidos e as florestas no mundo.....	15
<b>Figura 2.</b> Área de abrangência do Cerrado brasileiro.....	16
<b>Figura 3.</b> Modelo geral ilustrando os mecanismos de resistência/tolerância ao Al.....	20
<b>Figura 4.</b> <i>Qualea grandiflora</i> Mart. (Vochysiaceae).....	22
<b>Figura 5.</b> Fluxo de trabalho do experimento proteômico de raízes de <i>Q. grandiflora</i> , do desenho experimental até a análise dos dados.....	32
<b>Figura 6.</b> Germinação e cultivo de <i>Q. grandiflora</i> .....	38
<b>Figura 7.</b> Desenvolvimento da parte aérea de <i>Q. grandiflora</i> Mart. cultivadas na ausência de Al (plantas superiores) e na presença de Al (plantas inferiores).....	39
<b>Figura 8.</b> Raízes de <i>Q. grandiflora</i> após 90 dias de crescimento.....	39
<b>Figura 9.</b> Gel unidimensional (SDS-PAGE 10%) mostrando o perfil proteico das amostras de raízes de <i>Q. grandiflora</i> .....	40
<b>Figura 10.</b> Análise de componentes principais (PCA) para avaliação das diferenças entre o tratamento de raízes de <i>Q. grandiflora</i> com Al x controle (sem Al) e entre as replicatas biológicas.....	42
<b>Figura 11.</b> Proteínas reguladas agrupadas em <i>clusters</i> conforme seu perfil de abundância para cada condição testada.....	42
<b>Figura 12.</b> Distribuição das proteínas diferencialmente abundantes em <i>Q. grandiflora</i> em resposta ao Al, de acordo com os processos biológicos em que atuam.....	44
<b>Figura 13.</b> Principais categorias das vias metabólicas a partir das proteínas diferencialmente abundantes em raiz de <i>Q. grandiflora</i> que responderam ao tratamento com Al, investigadas utilizando-se a base de dados KEGG.....	45
<b>Figura 14.</b> Análise de interação proteína-proteína baseada no STRING com um <i>score</i> de confiança de interação (0.900).....	46

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Quantificação da extração de proteínas de raízes de *Qualea grandiflora* submetida a dois tratamentos (presença e ausência de Al).....40

**Tabela 2.** Análise qualitativa das proteínas identificadas em raízes de *Q. grandiflora*....41

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Proteínas diferencialmente abundantes identificadas em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao Al com *fold change*  $\geq 1,5$  a partir de análises LC-MS/MS.....77
- Anexo 2.** Análise de enriquecimento das vias metabólicas a partir das proteínas diferencialmente abundantes em raiz de *Q. grandiflora* que responderam ao tratamento com Al, investigadas utilizando-se a base de dados KEGG.....90
- Anexo 3.** Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG. Um total de 8 proteínas com *fold change*  $\geq 1,5$  reguladas positivamente foram encontradas na via de metabolismo do glicoxilato em raízes de *Q. grandiflora*.....91
- Anexo 4.** Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG. Um total de 5 proteínas com *fold change*  $\geq 1,5$  reguladas positivamente foram encontradas na via de fosforilação oxidativa em raízes de *Q. grandiflora*.....92
- Anexo 5.** Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG. Um total de 7 proteínas com *fold change*  $\geq 1,5$  reguladas positivamente foram encontradas na via de degradação de ácidos graxos em raízes de *Q. grandiflora*.....93
- Anexo 6.** Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG. Um total de 12 proteínas com *fold change*  $\geq 1,5$  reguladas positivamente foram encontradas na via de metabolismo de purina e pirimidina em raízes de *Q. grandiflora*.....94
- Anexo 7.** Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG. Um total de 6 proteínas com *fold change*  $\geq 1,5$  reguladas positivamente foram encontradas na via de metabolismo de metionina e cisteína em raízes de *Q. grandiflora*.....95
- Anexo 8.** Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG. Um total de 21 proteínas com *fold change*  $\geq 1,5$  reguladas positivamente foram encontradas na via de atividade ribossômica em raízes de *Q. grandiflora*.....96
- Anexo 9.** Proteínas de parede celular reguladas positivamente em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao Al com *fold change*  $\geq 1,5$  a partir de análises LC-MS/MS.....97
- Anexo 10.** Proteínas relacionadas à capacidade oxirredutora diferencialmente abundantes identificadas em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao Al com *fold change*  $\geq 1,5$  a partir de análises LC-MS/MS.....98
- Anexo 11.** Proteínas ribossomais reguladas positivamente em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao Al com *fold change*  $\geq 1,5$  a partir de análises LC-MS/MS.....102

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comumente encontrado na crosta terrestre. Várias formas químicas de Al são tóxicas para as plantas, peixes e humanos. Consequentemente, a presença desse metal é um dos principais fatores limitantes na produção agrícola em solos ácidos (Von Uexkull & Mutert, 1995).

No Cerrado brasileiro, na sua maior parte, os solos são distróficos, com baixo pH, e alto teor de Al (Lopes & Cox, 1977; Furley & Ratter, 1988). Em solos neutros ou levemente ácidos, o Al está principalmente sob a forma de depósitos insolúveis e encontra-se biologicamente inativo. Entretanto, em solos ácidos (pH < 5,5), o Al está na forma de Al<sup>3+</sup>, que é solúvel, tóxico e disponível para absorção das plantas (Kinraide, 1991).

Uma estratégia tradicional utilizada para neutralizar a acidificação dos solos é aumentando o seu pH pela aplicação de cal, aliviando assim a toxicidade ao Al. No entanto, essa abordagem é onerosa e ecologicamente inadequada do ponto de vista a longo prazo (Foy, 1984). Por essas razões, o melhoramento genético se torna uma estratégia mais efetiva para a produção de culturas economicamente importantes, tolerantes ao Al, em solos ácidos. Felizmente, as plantas exibem ampla variação em sua capacidade de lidar com a toxicidade ao Al, o que poderia tornar possível a criação de cultivares tolerantes.

Assim, a toxicidade ao Al tem sido um objeto de pesquisa de grande relevância, tendo em vista que plantas cultivadas em solos ácidos têm o seu crescimento e rendimento limitados pela presença desse metal. Contudo, pouca atenção tem sido dada à comunidade de plantas nativas, que toleram condições de solo ácido com altos teores de Al, não apenas do Cerrado mas em diversos outros biomas com condições edáficas similares (Von Uexkull & Mutert, 1995; Brunner & Sperisen, 2013).

Um exemplo desse tipo de plantas é o caso das Vochysiaceae, uma das famílias mais importantes dentre os grupos de plantas acumuladoras de Al possuindo um número considerável de espécies que acumulam esse metal. O grupo Vochysiaceae tem seu centro de diversidade na floresta tropical amazônica, mas espécies de todos os seus gêneros também ocorrem no Cerrado como por exemplo, *Q. grandiflora* (Haridasan & Araújo, 1987, 1988). Estudos indicam que *Q. grandiflora* pode acumular de 3,91 g a 5,16 g de Al.Kg<sup>-1</sup> de matéria seca (Andrade *et al.*, 2007; Silva Júnior *et al.*, 2005; Haridasan, 1982).

Em plantas sensíveis, a toxicidade ao Al inibe principalmente o crescimento da raiz. Consequentemente, a absorção de água e nutrientes diminuem, o que resulta num fraco crescimento e produção de biomassa (Ma & Furukawa, 2003). Os mecanismos fisiológicos para lidar com o Al estão sobretudo relacionados com a exsudação de ácidos orgânicos, como malato e citrato, que apresentam uma alta afinidade de ligação ao Al no apoplasto da raiz ou na rizosfera (Ma *et al.*, 2001). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos em resposta ao metal, não são ainda bem compreendidos. Uma vez que os processos biológicos são controlados por proteínas, a identificação e caracterização de proteínas responsivas ao Al, não só aumentará a compreensão dos mecanismos moleculares em resposta ao Al, mas também fornecerá novas informações que poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de uma variedade de culturas mais adaptadas a solos ácidos com alto teor de Al.

Portanto, o presente estudo propõe, pela primeira vez, uma análise sistêmica do proteoma radicular de *Q. grandiflora* visando identificar e quantificar proteínas diferencialmente reguladas em resposta ao Al. Para isso, as plantas foram cultivadas em solução nutritiva  $1/5$  MS (pH 4,8 - 5,2) suplementadas ou não (controle) com 150  $\mu$ M de cloreto de Al, por um período de 90 dias. Subsequentemente, proteínas totais de raízes de *Q. grandiflora* foram extraídas e digeridas com tripsina. As amostras foram analisadas utilizando uma técnica proteômica *label free* associada à cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa do tipo LTQ-Orbitrap.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

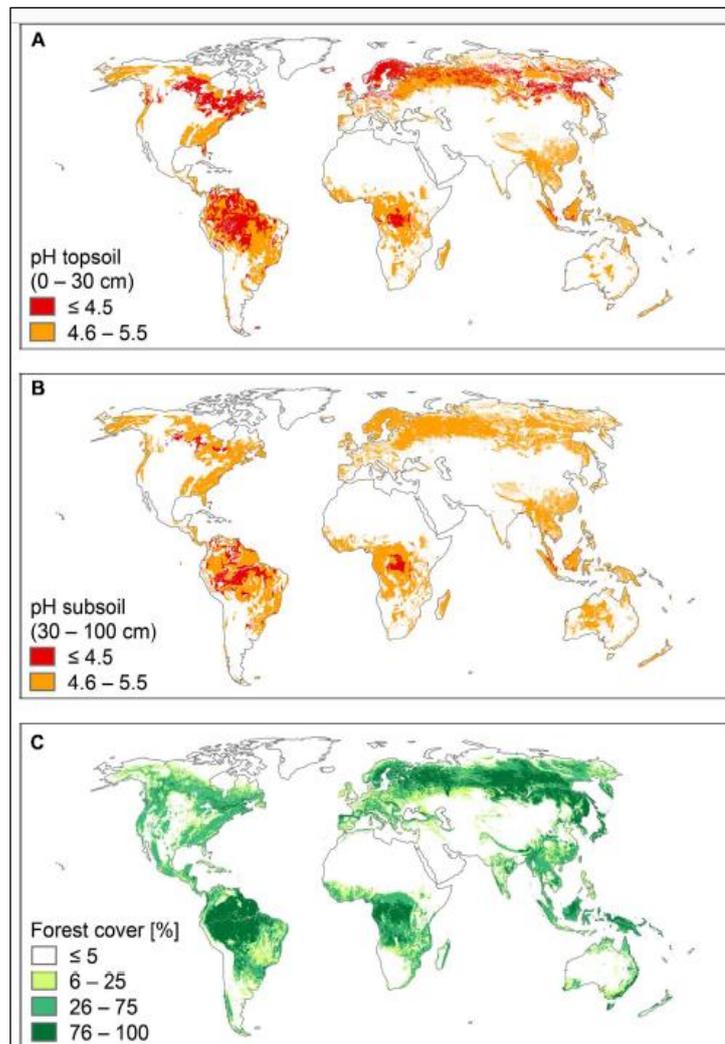
### 2.1. Presença de Al nos solos

O Al é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comumente encontrado na crosta terrestre. Várias formas químicas desse metal são tóxicas para as plantas, peixes e humanos (Von Uexkull & Mutert, 1995).

Além disso, o Al é um componente predominante na maioria dos solos e uma das principais fontes de estresse para as plantas sensíveis em solos ácidos. Em solos neutros ou levemente ácidos, o Al está principalmente sob a forma de depósitos insolúveis e se encontra biologicamente inativo, portanto, inofensivo para as plantas. Contudo, em solos ácidos (pH <5,5) a espécie preponderante é o  $Al^{3+}$ , que se constitui a sua forma mais tóxica para os vegetais (Kinraide, 1991; 1997; Brunner & Sperisen, 2013).

Os solos ácidos representam cerca de 30% da área de terra livre de gelo do mundo e ocorrem principalmente nos trópicos úmidos e região boreal, e compõem relevantes porções dos solos (cerca de 67%) cobertas por florestas (Figura 1) (Von Uexkull & Mutert, 1995; Brunner & Sperisen, 2013). A biodiversidade e alta produção de biomassa nos trópicos e floresta boreal sugere que suas plantas não são afetadas pela toxicidade ao  $Al^{3+}$  (Brunner & Sperisen, 2013).

Entretanto, esse metal é o principal fator limitante para a produção agrícola. Assim, a toxicidade ao  $Al^{3+}$  tem sido objeto de pesquisa há bastante tempo, visto que o crescimento e a produtividade de culturas são negativamente afetados por essa espécie de Al. Contudo, pouca atenção tem sido dada a esse tópico quando se trata de plantas do Cerrado, que naturalmente toleram o Al em solos ácidos.



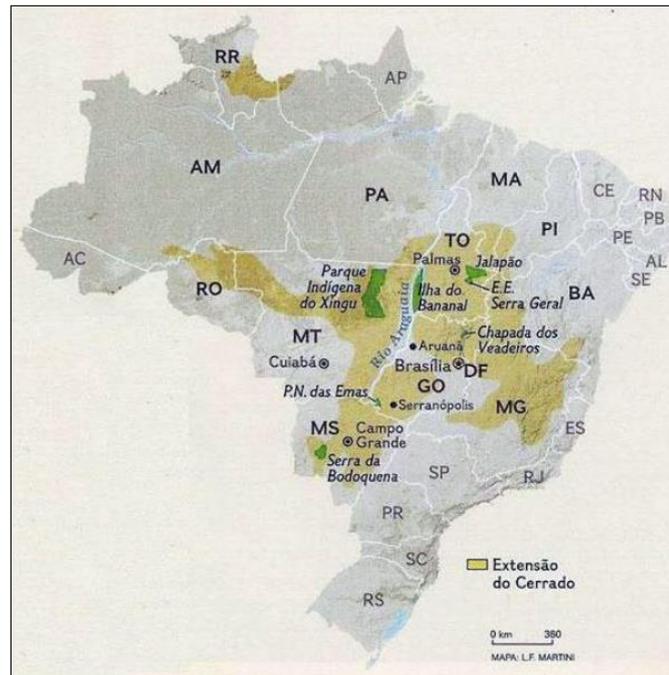
**Figura 1. Os solos ácidos e as florestas no mundo. (A)** pH do topo do solo (0-30 cm), **(B)** pH do subsolo (30-100 cm) e **(C)** cobertura florestal. O pH do solo é apresentado em duas classes:  $\text{pH} \leq 4.5$  (solos fortemente ácidos) e  $\text{pH}$  entre 4.6 - 5.5 (solos moderadamente ácidos) (Brunner & Sperisen, 2013).

## 2.2. O Cerrado

O bioma brasileiro denominado de Cerrado, abrange 2 milhões de  $\text{km}^2$  no Brasil Central, representando cerca de 23% da área total do país (Alvin e Araújo, 1952; Câmara, 1993). É considerado um bioma antigo, com rica biodiversidade, contendo aproximadamente 160.000 espécies de plantas, fungos e animais (Ratter *et al.*, 1997). Existem em torno de 800 espécies de árvores e arbustos de grande porte (2 a 8 m de altura), e quando são incluídas a flora das matas de galeria, florestas mesófilas e outros

ecossistemas do bioma, o número total de espécies de plantas vasculares é estimado em cerca de 10.000 (Ratter *et al.*, 1997).

A Figura 2 mostra a importância do Cerrado no contexto dos biomas do Brasil e sua concentração geográfica na região Centro Oeste do país. É importante notar que a instalação da atividade agropastoril ocorreu de forma rápida, colocando todo o bioma em risco de desaparecer (Revista escola 2013).



**Figura 2.** Área de abrangência do Cerrado brasileiro. (Fonte: Revista escola, 2013).

As árvores do Cerrado possuem características típicas de savanas, que geralmente, têm tronco retorcido, casca grossa de cortiça e folhas rígidas e escleromórficas; perenes, decíduas dependendo dos períodos secos/úmidos (Ratter *et al.*, 1997). Em geral, as árvores e plantas de pequeno porte têm flores grandes e coloridas fazendo com que o Cerrado se assemelhe a um belo e imenso jardim selvagem. A cobertura de solo do Cerrado tem cerca de até 60 cm de profundidade e consiste de espécies de gramíneas e ciperáceas misturadas com uma grande diversidade de herbáceas (Ratter *et al.*, 1997).

Comunidades nativas em savanas e florestas tropicais são ricas em espécies que estão bem adaptadas às condições edáficas específicas da região, como, por exemplo, acidez, alta saturação de Al e baixa disponibilidade de nutrientes (Lopes & Cox, 1977; Furley & Ratter, 1988; Haridasan, 2008). Assim, algumas espécies (normalmente lenhosas e perenes) desenvolveram a capacidade de acumulação de Al em seus órgãos

(>1,0 g de Al.Kg<sup>-1</sup> de matéria seca), sendo denominadas de acumuladoras de Al (Cuenca *et al.*, 1991; Jansen *et al.*, 2002).

Logo, as plantas podem ser classificadas de acordo com a sua sensibilidade ou resistência/tolerância ao Al. As plantas sensíveis ao Al são capazes de crescer apenas em solos com baixos níveis deste metal, enquanto que as plantas com resistência/tolerância moderada ou alta podem sobreviver em concentrações mais elevadas de Al (Jansen, 2002). Desta forma, as plantas podem ser classificadas como sensíveis, resistentes/tolerantes ou acumuladoras de Al (Kochian, 2015).

### **2.3. Efeito do Al em plantas: aspectos fisiológicos e bioquímicos**

Os efeitos do Al em plantas foram mais detalhados nos séculos XIX e XX, e a planta hortênsia francesa (*Hydrangea macrophylla* DC) foi objeto de estudo de vários fisiologistas e horticultores sobre a influência do Al nessa planta. (Allen, 1943; Chenery, 1946, 1948; Takeda *et al.*, 1985; Ma *et al.*, 1997). Adicionalmente, verificou-se que a cor azul da flor desta planta ornamental era dependente de uma elevada quantidade de Al nos tecidos da flor. Por outro lado, flores de tonalidade rosa tinham menores quantidades de Al nos tecidos florais (Chenery, 1946).

As plantas apresentam diferenças na resposta ao Al. Assim, tem havido esforços intensivos na investigação dos mecanismos envolvidos em resposta ao metal. Além disso, vários estudos sobre a resistência/tolerância ao Al com plantas cultivadas ilustraram a importância agrônômica deste problema (Carver & Ownby, 1995; Kochian, 1995, 2015; Larsen *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2015; Sade *et al.*, 2016).

Contudo, os mecanismos relacionados à toxicidade de Al<sup>3+</sup> ainda não foram totalmente compreendidos. Sabe-se, porém, que o Al<sup>3+</sup> interage com várias estruturas extra e intracelulares. Foi constatado que o Al<sup>3+</sup> modifica a parede celular, a permeabilidade da membrana plasmática, processos de transporte intracelulares, interrupção das vias de transdução de sinais e também se liga ao DNA das plantas (Kochian *et al.*, 2005).

Sabe-se que os efeitos do Al sobre os processos metabólicos das plantas ocorrem imediatamente após a interação com o metal, inicia a síndrome do estresse, e são seguidos por diversos efeitos como observado em arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*) (Wang *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016).

Assim, o Al interfere em uma considerável quantidade de enzimas, reduz a

deposição de polissacarídeos na parede celular, diminui a produção e transporte das citocininas e também modifica a estrutura e a função da membrana plasmática (Kochian, 2015). Como consequência, a exposição a longo prazo ao Al provoca graves danos aos sistemas radiculares, o que resulta na redução da absorção de água e nutrientes minerais, limitando a produção agrícola (Kochian, 2015).

Em plantas de trigo foi observado que o Al interage com a membrana plasmática e pode modificar a estrutura da membrana plasmática, assim como o ambiente iônico próximo da superfície da célula (Caldwell *et al.*, 1989; Bose *et al.*, 2011; Sade *et al.*, 2016). Este fato pode levar a distúrbios de processos de transporte iônico, e causar desequilíbrios nutricionais na planta, perturbando a homeostase celular (Caldwell *et al.*, 1989; Bose *et al.*, 2011; Sade *et al.*, 2016).

No sistema radicular, a toxicidade do Al está associada a alterações que prejudicam o funcionamento das raízes. Este metal afeta a divisão celular nas pontas das raízes (inclusive raízes laterais) pelo aumento da rigidez da parede celular através da reticulação (*crosslinking*) das pectinas. Adicionalmente, este metal pode reduzir a replicação do DNA através do aumento da rigidez da dupla hélice e alteração da estrutura da cromatina (Kochian, 2015; Sade *et al.* 2016).

#### **2.4. Mecanismos de resistência/tolerância ao Al**

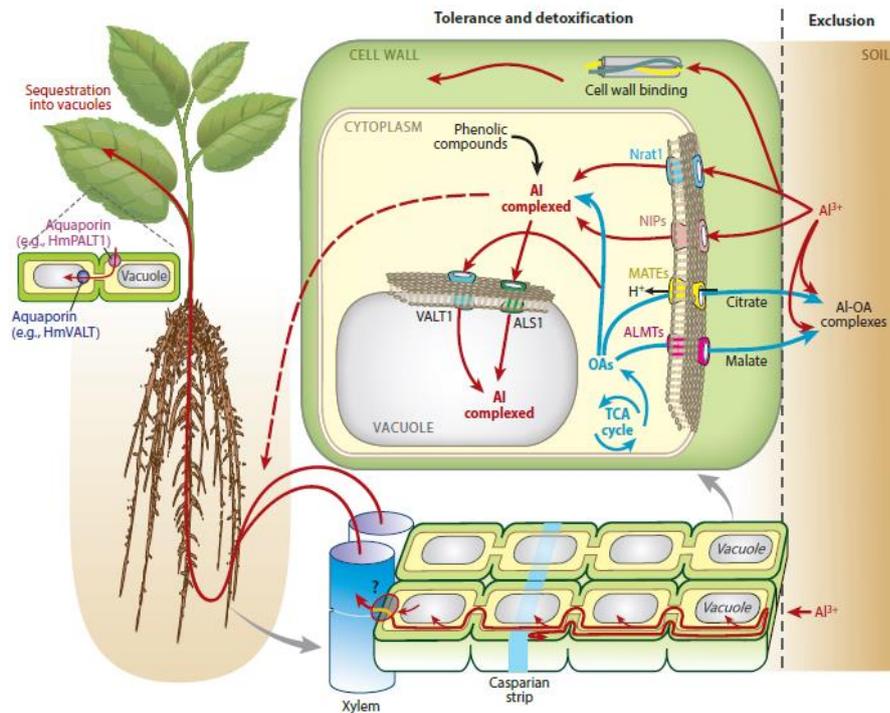
As respostas fisiológicas de plantas em solos com altos teores metálicos, o que inclui o Al, podem ser definidas como: acumuladoras, excludoras e indicadoras (Baker, 1981). Plantas acumuladoras são capazes de reter elevada quantidade de metais em seus tecidos quando comparados com os teores presentes no solo. Já as excludoras impedem a entrada de metais, especialmente, nas partes aéreas e tendem a mostrar níveis baixos de metais no seu interior. Por fim, as plantas indicadoras representam um tipo intermediário de resposta: os níveis de metais em todos os tecidos de espécies indicadoras geralmente refletem os níveis de metais no solo (Jansen, 2002).

Entretanto, duas categorias têm sido mais frequentemente usadas: resistência e tolerância, que levam em consideração mecanismos externos e internos de neutralizar os efeitos maléficos do Al (Ma *et al.*, 2001, Jansen, 2002). Durante as últimas décadas, numerosas hipóteses têm sido formuladas para explicar as diferenças de resistência/tolerância ao Al entre as plantas (Jansen, 2002).

A principal diferença entre estes processos é o local do mecanismo de resposta ao Al: no apoplasto (espaço externo ao protoplasto, composto pela parede celular e espaços intercelulares) ou no simplasto (espaço que compõe a estrutura interna do protoplasto via plasmodesmas). As plantas resistentes ao Al são também excludoras, pois normalmente restringem a entrada de Al no simplasto da raiz. Assim, essas plantas evitam que este metal atinja os tecidos internos e também a parte aérea da planta. Com base nisso, em geral as plantas resistentes têm baixas quantidades de Al que podem ficar em torno de  $0.1 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de matéria seca (Ma *et al.*, 2001). Os mecanismos fisiológicos para este recurso estão, sobretudo, relacionados com a exsudação de ácidos orgânicos, como malato e citrato, que se ligam ao Al no apoplasto da raiz ou na rizosfera (Ma *et al.*, 2001). Conseqüentemente, esse mecanismo externo ou de exclusão impede a entrada de Al no citoplasma das células.

Diferentemente, os mecanismos internos são aqueles que operam no simplasto, via plasmodesmas, e são responsáveis pela desintoxicação das células (Ma *et al.*, 2001). Desta forma, a desintoxicação interna de Al ocorre após a sua entrada no citoplasma através da formação de quelatos de Al por ácidos orgânicos, proteínas, ou outros ligantes orgânicos (Kochian *et al.*, 2015). Subseqüentemente, esse Al é compartimentalizado no vacúolo e outras organelas celulares (Taylor, 1991; Kochian, 1995; Ma *et al.*, 2001).

Assim, tem-se estabelecido que os mecanismos de resistência ao Al envolvem a exclusão de Al, impedindo que este metal entre nos tecidos via raiz (tanto no apoplasto quanto simplasto); e os mecanismos de tolerância, envolvem a entrada do Al na planta, o qual é posteriormente detoxificado e sequestrado por alguma molécula quelante (Figura 3) (Kochian *et al.*, 2015).



**Figura 3. Modelo geral ilustrando os mecanismos de resistência/tolerância ao Al. Al-exclusão e Al-detoxificação, elaborado por Kochian (2015).**

## 2.5. Plantas acumuladoras de Al

O interesse em estudar o Al aumentou nos últimos anos devido aos efeitos prejudiciais deste metal no meio ambiente e na saúde humana. No meio ambiente, com o processo de acidificação do solo (muitas vezes intensificado pela ação do homem devido à agricultura intensiva, mineração e descarte de resíduos); com o declínio das florestas; e morte de populações indígenas de peixes em lagos e rios (Foy *et al.*, 1978; Rao *et al.*, 1993). Em relação aos problemas ambientais, como o declínio florestal, algumas hipóteses alegam que a acidificação do solo, e, concomitantemente à solubilidade do Al são as principais causas das doenças das árvores (Godbold *et al.*, 1988; Roy *et al.*, 1988). E na saúde da população humana, o Al tem sido associado com doenças neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer (Exley, 1999; 2000).

Assim, a capacidade das plantas que conseguem lidar com este metal é um tópico de pesquisa relevante. Em muitas plantas, o teor médio de Al nos tecidos (p. ex. algumas herbáceas) é de aproximadamente 200 ppm (0,02%) de matéria seca (Hutchinson, 1943; 1945). Contudo, algumas plantas acumulam grandes quantidades de Al em suas folhas (mais de 1000 ppm) e, por isso, foram denominadas "plantas de Al" ou "acumuladoras de

Al" (Haridasan *et al.*, 2008). Com base na quantidade de Al nos tecidos vegetais, as plantas com menos de 0,1% de Al em matéria seca de suas folhas não são consideradas acumuladoras. (Hutchinson & Wollack, 1943; Hutchinson, 1945; Robinson & Edgington, 1945; Chenery, 1948; Jansen *et al.*, 2002).

De acordo com Jansen *et al.* (2002), essas acumuladoras de Al incluem principalmente táxons lenhosos e perenes de regiões tropicais, e esse caráter fitoquímico é encontrado em aproximadamente 45 famílias que pertencem em grande parte às eudicotiledôneas. Sendo particularmente comuns nos grupos das Rosídeas (Myrtales, Malpighiales, Oxalidales) e Asterídeas (Cornales, Ericales, Gentianales e Aquifoliales). Como exemplo, pode-se mencionar as *Miconias* (Melastomataceae), *Symplocos* (Symplocaceae), e *Vochysias* (Vochysiaceae).

Assim, um número considerável de espécies acumuladoras de Al são especialmente comuns nas famílias Proteaceae, Anisophylleaceae, Polygalaceae, Cunoniaceae, Rubiaceae e Vochysiaceae (Jansen *et al.*, 2002).

## **2.6. Vochysiaceae**

Vochysiaceae é uma das famílias mais importantes dentre os grupos de plantas acumuladoras de Al. É uma angiosperma, principalmente de regiões neotropicais, de espécies lenhosas, e divididas em dois grupos: Erismeeae (com dois gêneros) e Vochysieae (com cinco gêneros). O grupo Vochysieae tem um centro de diversidade na floresta tropical amazônica, mas espécies de todos os gêneros estão representadas no Cerrado, como por exemplo: *Qualea grandiflora*, *Qualea dichotoma*, *Qualea parviflora*, *Qualea multiflora*, dentre outras. Espécies do grupo Vochysieae são reconhecidas como plantas acumuladoras de Al já há bastante tempo (Haridasan & Araújo, 1987, 1988).

## **2.7. *Qualea grandiflora* (Mart.)**

É uma Vochysiaceae com características xeromórficas como a maioria das espécies da família, ocorre com frequência em solo distrófico com pH 4,5 a 4,7, e como todo o gênero *Qualea* é uma acumuladora de Al (Goodland, 1971, Lorenzi, 1992; Haridasan, 2005; Rodrigues & Araújo, 2013).

Popularmente conhecida como pau-terra, pau-terra-do-campo ou pau-terra-do-Cerrado, *Q. grandiflora* é uma árvore com até 15 m de altura, de tronco tortuoso com casca escura e rugosa e pouco espessa (Figura 4) (Silva Júnior *et al.*, 2005). Essa espécie se destaca por sua abundância nas diferentes fitofisionomias do Cerrado. Estudos indicam que *Q. grandiflora* pode acumular de 3,91 g a 5,16 g de Al.Kg<sup>-1</sup> de matéria seca, em diversos órgãos (Haridasan, 1982; Andrade *et al.*, 2007). Com base nisso, *Q. grandiflora* foi selecionada no presente estudo para análises proteômicas envolvendo os mecanismos moleculares relacionados ao metabolismo dessa planta nativa em resposta ao Al.

Adicionalmente, *Q. grandiflora* é uma espécie heliófita, pioneira e decídua, ocorrendo tanto em formações primárias como secundárias (Lorenzi, 1992). De acordo com Goodland (1971), *Q. grandiflora* é uma das espécies acumuladoras mais abundantes do Cerrado. Araújo (1984) reforçou esse conceito e destacou que essa espécie está entre as oito mais importantes do Cerrado no Distrito Federal.



**Figura 4.** *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). A- Visão geral da árvore adulta; B- Detalhes dos ramos; C- Flor; D- Fruto fechado; E- Fruto aberto (Adaptado de Silva, 2012).

## 2.8. Proteômica de plantas

Proteoma é o conjunto de proteínas presentes em um material biológico que está continuamente mudando em resposta a estímulos internos e externos sofridos pelo organismo (Wilkins *et al.*, 1995). A área da ciência que tem como objeto de estudo o proteoma de um organismo denomina-se proteômica. O campo da proteômica busca além de identificar, quantificar proteínas de forma precisa e confiável constatando as diferenças na abundância de proteínas em um organismo, célula ou tecido, num determinado momento ou sob condições específicas (Steen & Pandey, 2002; Ong *et al.*, 2003, 2005).

Em plantas, o principal objetivo da proteômica é estudar, conhecer e entender "onde" e "quando" são produzidas as diversas espécies/formas de proteínas individuais em um organismo vivo (Jorrín *et al.*, 2006; Smith & Kelleher, 2013). Essa área da ciência procura ainda entender como as proteínas interagem umas com as outras e com outros tipos de moléculas durante o crescimento e diferenciação celular, e como elas podem ser modificadas para se adequar às necessidades do crescimento e desenvolvimento programados (Jorrín, 2015). Além disso, as proteínas também podem interagir, de forma específica, com estímulos ambientais bióticos e abióticos.

Dessa forma, diferentes subáreas da proteômica podem ser definidas de acordo com os objetivos específicos tais como: (a) proteômica descritiva: catalogar tantos quantos possíveis tipos ou formas de proteínas a partir de um sistema experimental; e (b) proteômica comparativa/quantitativa: estabelecer diferenças nos perfis proteicos entre genótipos, tipos de células, tecidos, órgãos, estágios de desenvolvimento e fatores externos (Jorrín, 2015).

### 2.8.1. Proteômica descritiva

Na biologia, utiliza-se uma grande diversidade de modelos para investigar propriedades fisiológicas de organelas, células, tecidos ou de um espécime completo. No passado, nem todos os pesquisadores usaram *Arabidopsis* como modelo. Contudo, essa planta foi escolhida para esse fim devido a várias características que a fizeram um modelo ideal para estudos de relevância biológica (Remmerie *et al.*, 2011). No presente estudo, a escolha da planta *Q. grandiflora* foi com base na sua relevância biológica como planta

nativa, além de ser de germinação e cultivo fáceis. Entretanto, a escassez de dados moleculares referentes a esta espécie é um obstáculo para a análise dos dados.

Atualmente na base de dados do Uniprot (Lançamento 2017\_02 de 15-Fev-2017) existem um total de 553.655 entradas de proteínas revisadas, que inclui 38.457 entradas (7%) a partir de 2.006 espécies de plantas taxonomicamente diferentes, anotadas manualmente. Dentre as espécies mais representativas de plantas estão *Arabidopsis* e o arroz que respectivamente contêm 15.136 e 3.741 entradas revisadas. Em plantas de arroz por exemplo, surpreendentemente, apenas 15,1% das entradas na seção de proteínas revisadas foram registradas com evidência em nível proteico, ilustrando claramente a necessidade de esforços intensivos em estudos proteômicos de plantas (<http://www.uniprot.org/program/Plants> acessado em: 25/02/2017).

Quando uma espécie não tem seu genoma sequenciado, como *Q. grandiflora*, a atribuição funcional de proteínas depende de informações baseadas em homologia. Assim, para superar a barreira de espécies na identificação de proteínas ou genes, conceitos como homologia e ortologia são essenciais. As sequências homólogas derivam de uma sequência ancestral comum, e são chamadas ortólogas quando divergidas por um evento de especiação (inter-espécies), e como regra geral, são consideradas homólogas se compartilharem pelo menos 30-35% de similaridade na sequência de nucleotídeos (Fitch, 1970; Remmerie *et al.*, 2011). Devido a esta similaridade de sequência, as proteínas que não estão listadas numa base de dados de sequências nucleotídicas podem ainda ser identificadas com base na homologia de sequência de peptídeos (Remmerie *et al.*, 2011).

Assim, a identificação de uma proteína usando dados espectrais de massa depende de algoritmos que ajudam a determinar a homologia mais próxima, com uma entrada numa base de dados de sequência primária (Remmerie *et al.*, 2011).

Para se obter uma identificação confiável de proteínas a partir de espécies distintas, essencialmente duas abordagens distintas estão disponíveis: uma estratégia dependente de uma base de dados e a outra é independente de base de dados. Na primeira abordagem, os dados da sequência peptídica contendo a massa do íon precursor e uma lista de massas de íons produtos são pesquisados contra uma base de dados taxonomicamente restrita. E na segunda abordagem (a utilizada no presente estudo), não há uso de uma base de dados, em vez disso, o espectro de fragmentação é utilizado para derivar uma sequência *de novo*, e então as sequências obtidas são comparadas a um banco de dados por critérios de similaridade como descrito acima (Remmerie *et al.*, 2011).

Por exemplo o pacote PEAKS, um *software* disponível para a identificação de

peptídeos por meio do sequenciamento *de novo*, utilizando diferentes estratégias e um novo algoritmo para calcular eficientemente as melhores sequências peptídicas sem a utilização de uma base de dados (Ma *et al.*, 2003; Ma & Johnson, 2012).

### 2.8.2. Proteômica quantitativa

Análises quantitativas proteômicas permitem avaliar o comportamento funcional da dinâmica das proteínas, tanto na dimensão espacial como temporal (Remmerie *et al.*, 2011). Tradicionalmente, a quantificação de proteínas vinha sendo feita se utilizando uma abordagem de gel 2D comparativa (2D-PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*), através da qual as diferenças da abundância de proteínas eram determinadas pela comparação do volume dos *spots* de proteínas coradas, seguida pela identificação das proteínas por espectrometria de massa (MS) (Neilson *et al.*, 2011). Devido às suas limitações, esta técnica tem sido gradativamente substituída pela proteômica *gel free* (livre de gel).

Uma nova estratégia, usada por Roepstorff e colaboradores (2012), é a GeLC-MS/MS que após separar as proteínas por 1D-PAGE, se corta o gel e faz a digestão (em gel) das proteínas, seguido de LC-MS/MS.

Nos últimos anos, a observação da correlação entre a abundância de proteínas e a área dos picos cromatográficos (Chelius & Bondarenko, 2002), ou o número de espectros MS/MS (Liu *et al.*, 2004) ampliou a escolha de procedimentos analíticos no campo da proteômica quantitativa (Neilson *et al.*, 2011).

Com o desenvolvimento das técnicas *shotgun* (análise iniciada a partir de peptídeos), sem gel, tal como a tecnologia de cromatografia de proteínas multidimensional (MudPIT), a proteômica tem tido um rápido crescimento na quantificação de proteínas por MS, que eficientemente substitui as laboriosas comparações de imagens. Este avanço tem sido estimulado por mudanças na instrumentação de MS, o que possibilita quantificar muito mais proteínas de uma só vez (Neilson *et al.*, 2011).

A proteômica quantitativa pode ser dividida em duas abordagens principais: 1) com a utilização de marcadores isotópicos estáveis, e; 2) utilizando-se técnicas sem marcação, onde os peptídeos são quantificados a partir da área dos picos dos peptídeos antes da fragmentação (MS1) ou pela contagem dos picos formados depois da fragmentação

(MS2).

A técnica proteômica *shotgun* sem marcação, utilizada no presente estudo, produz um volume de dados que requer uma avaliação estatística rigorosa. Embora seja necessária a utilização de softwares sofisticados, existem muitas aplicações disponíveis para a análise quantitativa sem marcação, sendo amplamente aceita como uma técnica confiável.

### **2.8.3. Técnicas proteômicas *label free* (sem marcação)**

A quantificação de proteínas sem marcação, técnica utilizada neste trabalho, pode ser dividida em dois grupos distintos: a) área sob a curva (AUC) ou a medida da intensidade do sinal baseado em espectros de íon precursor; e, b) a contagem espectral que se baseia na contagem do número de peptídeos alinhados a uma determinada proteína em um experimento MS/MS (Neilson *et al.*, 2011).

A AUC ou medida da intensidade de sinal baseado em espectros de íon precursor é uma abordagem sem marcação precisa utilizada para MS quantitativa, e envolve a medição integrada das áreas de picos cromatográficos para um determinado peptídeo em corrida LC-MS (Chelius & Bondarenko, 2002).

No geral, o processo de quantificação de proteínas baseado na AUC envolve a medição da abundância de íons com tempos específicos de retenção para os peptídeos ionizados, sem a utilização de um isótopo padrão estável, e que, muitas vezes é referido como contagem de íons (Podwojski, *et al.*, 2010). Como os peptídeos ionizados eluem a partir de uma coluna de fase reversa para o espectrômetro de massa, a intensidade dos íons pode ser medida dentro dos limites de detecção fornecidas na configuração experimental. Assim, os peptídeos diferencialmente abundantes podem ser quantificados por LC-MS/MS, subsequentemente ou simultaneamente (Neilson *et al.*, 2011).

Neste trabalho foi utilizado um espectrômetro de massas híbrido, que combina características de dois tipos distintos de analisadores de massa acoplados no mesmo equipamento, para aumento da capacidade e performance do instrumento. Conjugando um armazenador de íons (*ion trap*), com um analisador orbital (Orbitrap).

## 2.9. Proteínas reguladas em plantas em resposta ao Al

Diversos genes e proteínas são induzidos quando submetidos a algum tipo de estresse ou qualquer outro estímulo biótico ou abiótico, e estão associados a diferentes rotas metabólicas. Quando se trata de genes e proteínas em plantas do Cerrado envolvidos na tolerância/acúmulo de Al, praticamente, nada se conhece. Entretanto, estudos sobre esse tópico têm sido realizados com várias outras plantas, tais como: soja (*Glicine max*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oriza sativa*), *A. thaliana*, citros (*Citrus* sp.) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (Zhen *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Mangeon *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016).

Em *Arabidopsis* a ausência de atividade dos genes *STOP1*, que codifica proteínas do tipo *Zinc Finger* (Iuchi *et al.*, 2007; Sawaki *et al.*, 2009), e controla a expressão de *AtALMT1*, gene que codifica proteínas transportadoras de malato (Hoekenga *et al.*, 2006), resultou em hipersensibilidade ao Al nestas plantas.

Além disso, a superexpressão do gene *WAK1* que codifica uma quinase associada à parede celular e cuja expressão é induzida por diversos tipos de estresses, aumentou sensivelmente a tolerância ao Al em *Arabidopsis* (He *et al.*, 1999). Ao que parece, grande parte desses genes não são constitutivamente expressos em plantas, e, portanto, têm um padrão induzível de expressão. Além do mais, os genes associados à tolerância ao Al estão envolvidos em várias rotas metabólicas, e, de forma geral, a superexpressão desses genes, independentemente de qual rota estão associados, parece ser eficiente no aumento da tolerância a esse metal (Decreux & Messiaen, 2005).

Adicionalmente, em raízes de arroz expostas ao Al foram identificadas 12 proteínas reguladas positivamente e cinco reguladas negativamente. Dentre as que foram reguladas positivamente a atividade da cisteína sintase (CS) desempenhou um papel fundamental na tolerância do arroz ao Al (Yang *et al.*, 2013). Ainda em arroz, Wang e colaboradores (2014) isolaram 106 proteínas diferencialmente abundantes em raízes crescidas com Al. Os resultados indicaram que a ativação da via glicólise/gliconeogênese, induzida pelo Al, pode ser uma maneira rápida e eficaz de equilibrar os níveis de energia disponíveis e assim prevenir que haja falta de energia para lidar com os efeitos negativos do Al.

Estudos similares têm sido feitos em outras plantas. Li *et al.* (2016) analisaram o proteoma foliar de duas espécies de citros e identificaram 324 proteínas diferencialmente abundantes. Destas, 307 estavam presentes somente em *Citrus sinensis*, e 14 unicamente

em *Citrus grandis*. Outrossim, apenas três proteínas diferencialmente abundantes foram compartilhadas entre as duas espécies. Em *C. grandis*, observou-se a inibição da fotossíntese e diminuição do teor de proteínas totais solúveis. Já em *C. sinensis* ocorreu uma maior quantidade de proteínas que responderam à toxicidade do Al. Com base nesses dados se concluiu que *C. grandis* foi mais intolerante ao Al que *C. sinensis* (Li *et al.*, 2016). Desta forma, pode-se inferir que a manutenção da fotossíntese e balanço de energia via indução de proteínas a processos relacionados, assim como a regulação positiva de proteínas responsivas a baixos níveis de fósforo e menor aumento da exigência para a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram consideradas excelentes ferramentas para aumentar a capacidade total de desintoxicação, e foram considerados como a razão da maior tolerância ao Al em *C. sinensis* (Li *et al.*, 2016).

Também em citros, Jiang *et al.* (2015) isolaram mais proteínas responsivas a toxicidade ao Al em raízes de *C. sinensis* tolerante ao Al, do que em raízes de *C. grandis*. Este fato sugere que uma maior flexibilidade metabólica pode contribuir para uma maior tolerância ao metal em *C. sinensis* (Jiang *et al.*, 2015).

Outra planta que teve seu proteoma investigado em resposta à presença de Al foi a soja. Em uma cultivar de soja resistente ao Al foi observado que proteínas relacionadas à defesa/estresse, transdução de sinal, transporte, enovelamento de proteínas, regulação gênica e metabolismo primário foram fundamentais para a sobrevivência dessas plantas sob toxicidade ao Al (Zhen *et al.*, 2007). Adicionalmente, ocorreram alterações nos perfis de proteínas de raiz de soja entre os genótipos tolerante e sensível ao Al. Na presença do metal foram detectadas diferenças em abundância de enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos orgânicos e sistemas de desintoxicação (Duressa *et al.*, 2011). Concluiu-se que a maior abundância de proteínas envolvidas nesses processos desempenham um papel crucial no aumento da tolerância de soja ao Al (Duressa *et al.*, 2011).

## **2.10. Plantas transgênicas conferindo maior tolerância ao Al**

Abordagens transgênicas têm sido identificadas como métodos potencialmente poderosos para aumentar a tolerância de plantas ao Al em solos ácidos (Ryan *et al.*, 2011; Kochian *et al.*, 2015). Até o momento, vários genes envolvidos em diferentes processos biológicos (incluindo metabolismo de ácidos orgânicos, resposta ao estresse e transporte

de ácidos orgânicos) foram introduzidos com êxito em diversas plantas, resultando em plantas transgênicas mais tolerantes ao Al (Ryan *et al.*, 2011). Em arroz-feijão (*Vigna umbellata*) por exemplo, a superexpressão de *VuFDH* um gene envolvido no metabolismo de formato aumentou a tolerância ao Al (Lou *et al.*, 2016).

Em trabalhos anteriores, a introdução de genes associados com a produção de ácidos orgânicos como o da malato desidrogenase em alfafa (*Medicago sativa*) (Tesfaye *et al.*, 2001) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Wang *et al.*, 2010), o da citrato sintase em tabaco (de la Fuente *et al.*, 1997), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) (Koyama *et al.*, 2000), couve-nabiça (*Brassica napus*) (Anoop *et al.*, 2003), e alfafa (Barone *et al.*, 2008) conferiram maior tolerância ao Al nessas plantas.

Em *A. thaliana* transgênica, a superexpressão do gene *AtBCB* (*Arabidopsis blue copper-binding proteins*) induziu a diminuição do acúmulo de calose nas paredes celulares e resultou em menor teor de Al na região da ponta da raiz (Ezaki *et al.*, 2001). Assim, é possível que essas *blue copper-proteins* possam suprimir a absorção de  $Al^{3+}$ , aumentando assim a resistência das plantas ao metal (Ezaki *et al.*, 2001).

Mais recentemente, um outro gene introduzido também em *A. thaliana* que codifica uma S-adenosil metionina sintetase (SAMS), denominado *AvSAMS1* obtido a partir de uma biblioteca de cDNA derivada de uma poaceae altamente tolerante ao Al, *Andropogon virginicus* L. foi capaz de aumentar a tolerância ao Al nessa planta (Ezaki *et al.*, 2016).

Em trabalhos anteriores, o grupo de pesquisa de BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS – CERRADO, do Departamento de Botânica da UnB, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira tem objetivado, ao longo dos anos, compreender os mecanismos metabólicos que envolvem o Al em plantas do Cerrado. Estas pesquisas envolvem estudos utilizando as ferramentas moleculares, tais como genômica, metabolômica, transcriptômica e proteômica, bem como, estudos fisiológicos e anatômicos. No presente trabalho foram estudados os perfis proteicos em resposta ao Al em raízes de *Qualea grandiflora*, uma espécie acumuladora da família Vochysiaceae.

### 3. JUSTIFICATIVA

O Al é um dos metais mais abundantes em solos, e sua toxicidade é muitas vezes o principal fator limitante na produtividade de culturas tradicionais. No Cerrado, muitas espécies nativas estão adaptadas a essas condições de altos níveis de Al e elevada acidez no solo, possuindo alterações fenotípicas e genotípicas que são resultantes da pressão seletiva sofrida por essas plantas ao longo do processo evolutivo. Além disso, essas espécies ainda são capazes de acumular grandes quantidades desse metal, e parecem necessitar dele para crescer e se desenvolver normalmente. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são pouco conhecidos. Assim, este estudo visa a identificação de proteínas diferencialmente abundantes, reguladas em resposta ao Al, no intuito de fornecer uma melhor compreensão deste mecanismo em plantas nativas, como a *Q. grandiflora*. Essa proposta, portanto, é de crucial importância tanto para programas de conservação destas plantas, quanto para o melhoramento genético de plantas cultivadas, uma valiosa estratégia para o desenvolvimento de práticas agrícolas com menor impacto ambiental e aumento da produtividade de forma sustentável e ecologicamente equilibrada.

## 4. OBJETIVO GERAL

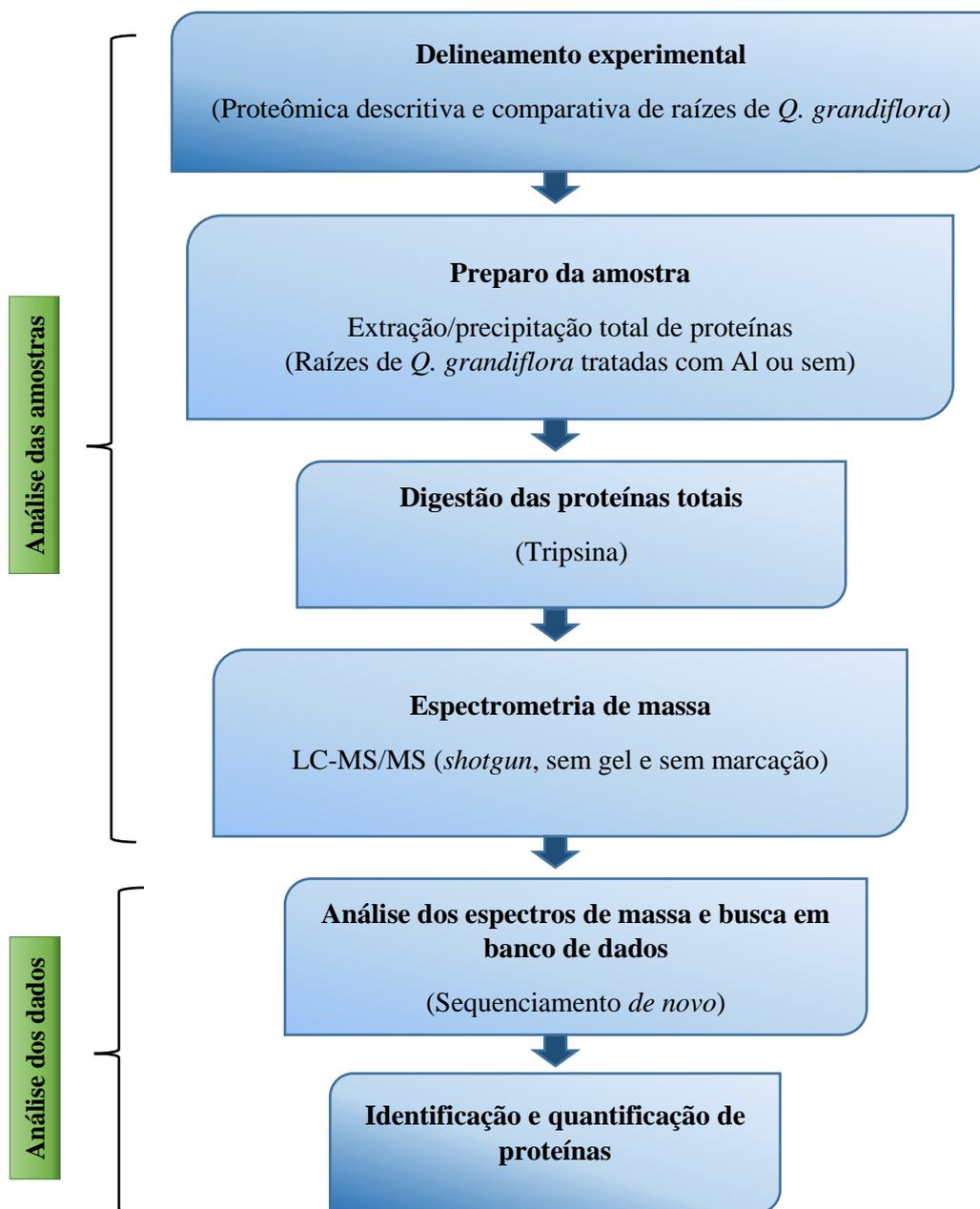
Realizar uma análise proteômica comparativa a partir de raízes de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) tratadas com Al x controle (sem Al), a fim de identificar proteínas diferencialmente abundantes em resposta ao Al.

### 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Sequenciar e descrever o proteoma radicular de *Q. grandiflora*;
- Identificar e quantificar proteínas diferencialmente abundantes em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao Al;
- Classificar as proteínas diferencialmente abundantes de acordo com os processos biológicos em que atuam;
- Identificar importantes vias metabólicas reguladas em raízes de *Q. grandiflora* associadas com a resposta ao Al;
- Analisar interações entre as proteínas diferencialmente reguladas identificadas em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao Al;
- Obter informações sobre os mecanismos moleculares de plantas nativas em resposta ao Al;
- Submeter os dados obtidos a uma base de dados.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Um fluxograma foi elaborado indicando as principais etapas realizadas no estudo de análise proteômica a partir de raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao Al (Figura 5).



**Figura 5.** Fluxo de trabalho do experimento proteômico de raízes de *Q. grandiflora*, do desenho experimental até a análise dos dados.

## 5.1. Material vegetal

Frutos de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) foram coletados em área de Cerrado *stricto sensu*, na Fazenda Dois Irmãos (Água Fria de Goiás-GO) e deixados à temperatura ambiente para que houvesse uma deiscência completa e liberação das sementes (coordenadas geográficas: 14 42'31.37" S 47 40'13.11" W). As sementes foram germinadas e posteriormente cultivadas na presença e ausência de Al.

Exsiccatas da planta alvo das coletas também foram preparadas e depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UnB).

## 5.2. Crescimento das plantas e tratamento com Al

As sementes foram desinfestadas utilizando álcool 70% por 1 minuto, e em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 30 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água bidestilada autoclavada, colocadas em placas de Petri esterilizadas sobre papel germitest embebido com água destilada autoclavada e incubadas em câmara de crescimento BOD a 25 °C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 18 h.

Trinta dias após a germinação, as plantas foram selecionadas e transferidas para os ensaios. A seleção das plantas foi feita considerando as condições de saúde (cotilédones sem sinais de clorose), uniformidade de tamanho, e sistema radicular variando em torno de 2-3 cm de comprimento. Em seguida, as plantas foram transferidas para sacos plásticos contendo vermiculita esterilizada. A solução nutritiva MS (Murashige & Skoog, 1962) foi utilizada na proporção de  $\frac{1}{5}$  para ambas condições (tratadas com Al e controles sem Al), sem adição de açúcares e vitaminas. Para o tratamento com Al, foi adicionado 150  $\mu$ M de  $AlCl_3$  (cloreto de Al) na solução nutritiva e o pH ajustado entre 4,8 e 5,2 com o intuito de manter o Al solubilizado.

Durante o período experimental de 90 dias, as plantas foram mantidas em sala de crescimento a 25 °C, 70% de umidade relativa, e fotoperíodo de 18 h. As soluções nutritivas eram repostas a cada dois dias.

Amostras de raízes totais de *Q. grandiflora* relativas ao tratamento com Al ou sem (controle) foram coletadas após 90 dias de tratamento, sendo um *pool* de seis plantas para cada repetição biológica, realizada em triplicatas, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer - 80 °C para posterior extração de proteínas.

### **5.3. Extração e quantificação de proteínas para análise LC-MS/MS**

Uma porção de 100 mg de tecido (raiz) foi macerado em cadinho e pistilo com nitrogênio líquido até se obter um pó fino. O pó foi adicionado a uma solução de acetona gelada contendo 10% de ácido tricloroacético (TCA) e 0,07% de  $\beta$ -mercaptoetanol e a suspensão resultante foi homogeneizada por agitação em vórtex e incubada a 4 °C por 3 h. Após centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado cinco vezes com 2 mL de acetona contendo 10% de TCA até o desaparecimento de pigmentos.

O pellet foi seco utilizando um concentrador a vácuo e posteriormente ressuspendido em tampão de reidratação contendo 7 M de uréia, 2 M de tiuréia e TEAB 250 mM, e o pH ajustado para 8,5. A concentração de proteína foi determinada com Qubit 2.0 (Invitrogen) e a qualidade foi verificada em gel unidimensional SDS-PAGE 10%.

### **5.4. Eletroforese unidimensional**

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% e 0,75 mm de espessura, para análise da qualidade do extrato proteico. Foram aplicados 25  $\mu$ g de cada amostra. A separação eletroforética foi realizada a 20 °C e corrente constante de 35 mA. Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com Comassie Brilliant Blue *overnight*.

### **5.5. Digestão proteica para análise LC-MS/MS**

Após quantificação das proteínas, as amostras foram reduzidas e alquiladas, antes da digestão trípica em solução.

Proteínas (200  $\mu$ g) foram reduzidas com ditioneitol (DTT) 10 mM por 60 minutos a 56 °C e alquiladas com iodoacetamida (IAA) 100 mM por 60 minutos a 37 °C no escuro. A amostra foi diluída em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (bicarbonato de amônio) 100 mM pH 8,1. As proteínas alquiladas foram digeridas utilizando 2% de tripsina (PROMEGA) a 37 °C por 16 h.

Após digestão, a solução resultante de peptídeos foi acidificada a uma concentração final de 0,1% pela adição de TFA e centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante de peptídeos obtido foi dessalinizado em micro colunas caseiras *stage tips* (C18), seco à vácuo e ressuspendido em ácido fórmico 0,1% para posterior análise por nano cromatografia líquida, acoplada a um espectrômetro de massa do tipo LTQ Orbitrap Elite.

## 5.6. Análise dos peptídeos por nano-LC-MS/MS

Os peptídeos obtidos por digestão trípica foram aplicados em cromatógrafo líquido Dionex para nano cromatografia de fase reversa nas seguintes condições: Para cada repetição biológica foram realizadas três replicatas técnicas, aplicando-se alíquotas de 1 µg de misturas de peptídeos, injetados em uma coluna de aprisionamento (*trap-column*) com 2 cm x 100 µm, contendo partículas de C18 5 µm para concentração. Foram eluídos dessa coluna para uma coluna analítica (32 cm x 75 µm, C18 3 µm) e desta para a fonte de ionização do espectrômetro. O gradiente de eluição composto por ácido fórmico 0,1% em água (solvente A) e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (solvente B), em um gradiente de 2 a 35% de solvente B durante 200 minutos.

As frações eluídas diretamente na fonte de ionização do espectrômetro de massa do tipo LTQ Orbitrap Elite foram analisadas em modo DDA (aquisição dependente de dados), gerando espectros MS1 no analisador Orbitrap (com resolução de 120.000 FWHM a 400 m/z) entre as massas 300-1650 m/z e exclusão dinâmica de 10 ppm. Para cada espectro MS1, foram escolhidos automaticamente os 15 íons mais intensos com cargas acima de 2 e direcionados à fragmentação por dissociação induzida por colisão de alta energia - HCD (*high-energy collision dissociation*). A configuração para HCD foi: janela de isolamento de 2.0 m/z em 20 s, com o controle automático de ganho (AGC) de  $1 \times 10^6$ , e tempo de preenchimento máximo (maximum TI) de 100 ms, com energia de colisão normalizada em 35% e limiar para a seleção de 3000.

## 5.7. Identificação e quantificação das proteínas

Os arquivos contendo os dados das amostras foram obtidos no formato .RAW a partir do espectrômetro de massas, e analisados por meio dos programas *Progenesis*<sup>®</sup> 4.1 e *Peaks*<sup>®</sup> 7.0 para análise de dados do tipo *label free* (sem marcação).

Os espectros obtidos foram alinhados e a quantificação de cada peptídeo calculada a partir da área de intensidade integrada a partir dos picos gerados pelos respectivos íons. Tais cálculos foram realizados com auxílio do *software Progenesis*<sup>®</sup>. Uma vez quantificados e agrupados os eventos correspondentes a peptídeos, a identificação de proteínas foi realizada com auxílio do *software Peaks*<sup>®</sup>, que fez a dedução de sequências a partir das informações de fragmentação, realizando uma busca a partir de dados de sequências do transcriptoma de *Qualea grandiflora* (130.704 sequências - *Searched Entry*), submetido à base de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sob o número de BioProjeto PRJNA358394, mas ainda não publicado).

As buscas foram realizadas com os seguintes parâmetros: precisão MS de 10 ppm, utilizando massa monoisotópica, precisão de massa dos fragmentos MS/MS de 0,05 Da, carbamidometilação da cisteína como modificação fixa, e oxidação da metionina e deamidação (NQ) como modificações variáveis. Tripsina foi selecionada como a enzima da digestão, e permitidos até dois sítios de clivagem perdidos por peptídeo.

O número de proteínas foram filtrados com uma taxa para detecção de falsos positivos de 1% (FDR - *False Discovery Rate*) que foi determinado com base na procura de uma base de dados invertida, gerada automaticamente pelo *Software Peaks*<sup>®</sup>, pela inversão da sequência de cada entrada, e um mínimo de 1 peptídeo único por proteína foi aceito para a identificação ( $\geq 1$ ).

As informações de identificação de proteínas foram inseridas no programa *Progenesis*<sup>®</sup>, que as combinou com os dados quantitativos gerados anteriormente.

Neste estudo, uma proteína foi considerada diferencialmente abundante quando apresentou *fold-change*  $\geq 1,5$  e  $p \leq 0,05$ .

## 5.8. Análises estatísticas

Ainda utilizando o programa *Progenesis*<sup>®</sup>, foi realizada análise estatística multivariada para avaliação das diferenças entre as condições e entre as replicatas, onde esperou-se encontrar na análise de PCA (análise de componentes principais) um agrupamento entre as replicatas e distanciamento entre as condições.

Foi realizado teste ANOVA, de forma que fossem selecionadas as proteínas que apresentaram abundância com diferenças significativas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ). Dessa forma, proteínas reguladas foram submetidas ao agrupamento em *clusters* conforme seu perfil de abundância nas condições estudadas (tratamento com AI x controle sem AI).

## 5.9. Análise de ontologia gênica (GO)

As proteínas diferencialmente abundantes identificadas foram submetidas ao programa Blast2GO, e classificadas de acordo com os processos biológicos em que atuam. Foram buscadas correlações entre as proteínas presentes em quantidades diferentes entre as condições (tratamento com AI x controle sem AI).

## 5.10. Análise de vias metabólicas

Análises de vias metabólicas foram realizadas por meio de busca na base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) utilizando-se o servidor BlastKOALA (*KEGG Orthology And Links Annotation*) (Kanehisa *et al.*, 2016) para anotação funcional com os seguintes parâmetros: grupo taxonômico *Plants* e base de dados *family\_eukaryotes* como dados de referência, para se verificar enriquecimentos de sobreposição entre os dados obtidos no presente estudo e vias contidas no banco.

## 5.11. Análise das interações proteicas

As proteínas identificadas como diferencialmente abundantes também foram pesquisadas quanto à sua interação com outras proteínas, com a utilização de ferramentas de bioinformática tais como o programa STRING 10.0 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) acessível em <http://string-db.org>, (Szklarczyk *et al.*, 2015).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Germinação e desenvolvimento das plantas

As sementes de *Q. grandiflora* germinaram por volta do sétimo dia após terem sido colocadas em placas de Petri (Figura 6-A). Em geral, a emissão dos cotilédones ocorreu 15 dias após a germinação (Figura 6-B), e logo adquiriram a coloração verde/verde escura e mantiveram-se aderidos às plantas durante todo o período de análise, que foi de 90 dias (Figura 6-C).



**Figura 6. Germinação e cultivo de *Qualea grandiflora*.** A) Sementes de *Q. grandiflora* germinadas em placas de Petri após sete dias de cultivo. Note o rompimento do tegumento e a presença de raízes. B) Plantas de *Q. grandiflora* com cotilédones após 15 dias de cultivo e C) Plantas de *Q. grandiflora* com 90 dias de cultivo.

## 6.2. Efeito do Al no desenvolvimento das plantas de *Q. grandiflora*

As plantas de *Q. grandiflora* controle (sem suplementação de Al) e as tratadas com Al com aproximadamente 90 dias de idade apresentaram diferenças morfológicas entre si. Na parte aérea as plantas suplementadas com Al se apresentaram com folhas maiores e aspecto mais saudável (Figura 7).



**Figura 7.** Desenvolvimento da parte aérea de *Q. grandiflora* Mart. cultivadas na ausência de Al (plantas superiores) e na presença de Al (plantas inferiores).

Além disso, o sistema radicular das plantas crescidas com Al tinham raízes claramente maiores e com mais raízes laterais que as das plantas controle (Figura 8 A e B).



**Figura 8.** Raízes de *Q. grandiflora* após 90 dias de crescimento. A) Raízes das plantas tratadas com Al; B) Raízes das plantas controle (sem Al).

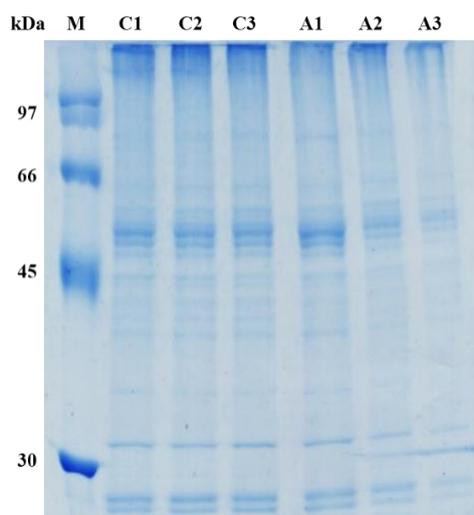
### 6.3. Quantificação e análise qualitativa das proteínas

A Tabela 1 mostra a quantidade de proteínas totais extraídas em triplicata, de raízes de plantas de *Q. grandiflora* cultivadas com e sem Al (controle), após 90 dias de cultivo. A quantidade de proteínas totais extraídas das plantas controle e suplementadas com Al não tiveram grande variação. Em média, a quantidade de proteína extraída para plantas controle foi 242,67  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e para plantas tratadas 288  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

**Tabela 1.** Quantificação da extração de proteínas de raízes de *Qualea grandiflora* submetida a dois tratamentos (presença e ausência de Al).

Amostras/tratamentos	Concentração de proteínas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
Controle 1	303
Controle 2	220
Controle 3	205
Alumínio 1	340
Alumínio 2	268
Alumínio 3	256

As amostras de proteínas totais extraídas de raízes de *Q. grandiflora* provenientes do tratamento com Al e controle (sem Al) apresentaram boa definição das bandas proteicas, indicando que não houve degradação das amostras durante o processo de extração (Figura 9).



**Figura 9.** Gel unidimensional (SDS-PAGE 10%) mostrando o perfil proteico das amostras de raízes de *Q. grandiflora*. M – Marcador de massa molecular; C1-C3 – Réplicas da extração de proteínas totais das plantas controle; A1-A3 – Réplicas da extração de proteínas totais das plantas tratadas com Al. Foram aplicadas 25  $\mu\text{g}$  de proteína.

#### 6.4. Identificação e análise qualitativa das proteínas de raízes de *Q. grandiflora*

Após o tratamento de plantas de *Q. grandiflora* com Al e sem (controle), proteínas totais de raízes extraídas foram analisadas por proteômica quantitativa *label free* e LC-MS/MS. Essas análises identificaram um total de 2520 proteínas com base no banco de dados do transcriptoma de *Q. grandiflora*, a partir de 94440 MS/MS *Scans* (Tabela 2).

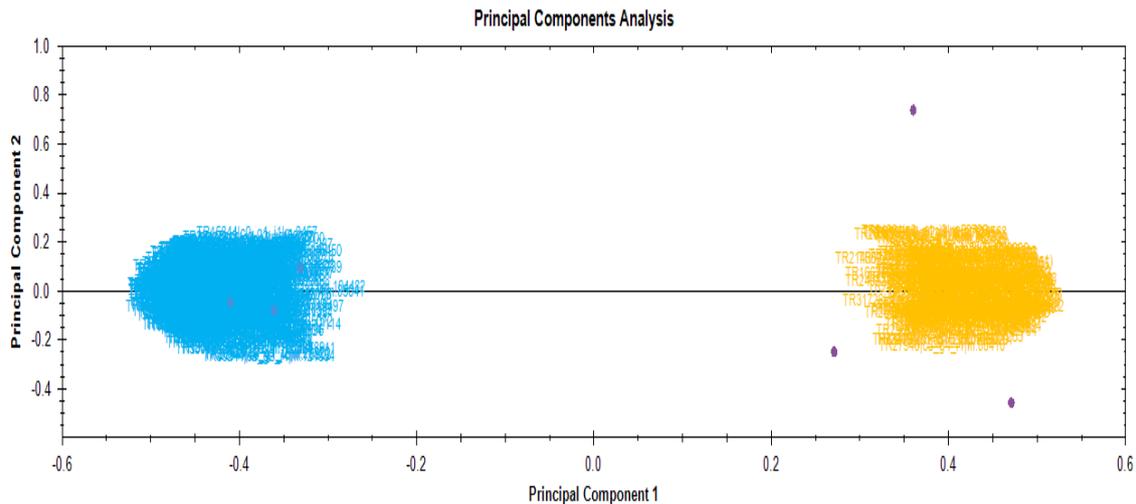
**Tabela 2.** Análise qualitativa das proteínas identificadas em raízes das plantas controle (sem Al) de *Qualea grandiflora*.

Análise qualitativa dos dados	
<b>Estatística dos dados</b>	
Número de MS <i>Scans</i>	34228
Número de MS/MS <i>Scans</i>	94440
<b>Estatística dos resultados filtrados</b>	
Peptídeos-espectros <i>matches</i>	39874
Sequências de peptídeos	10032
Grupos de proteínas	1351
Número de proteínas <sup>a</sup>	2520
Proteínas (número de peptídeos únicos)	1344 (>2); 458 (=2); 718 (=1)
Espectros de Novo	4155

<sup>a</sup>Número de proteínas identificadas com  $\geq 1$  peptídeos únicos e FDR 1%.

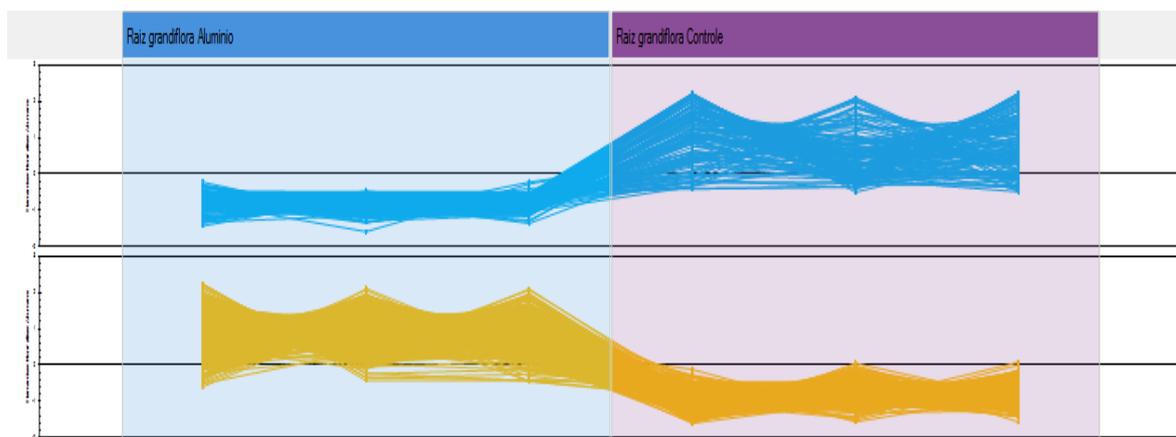
#### 6.5. Análises estatísticas

A análise estatística multivariada de componentes principais (PCA) mostrou um agrupamento entre as três replicatas biológicas e distanciamento entre as condições, mostrando que a variabilidade entre as repetições foi menor que entre os tratamentos. Estes dados indicam uma boa reprodutibilidade dos resultados, com uma alteração consistente nos proteomas de raízes de *Q. grandiflora* entre as três repetições biológicas dentro do grupo tratado com Al versus o grupo controle não tratado (Figura 10).



**Figura 10.** Análise de componentes principais (PCA) para avaliação das diferenças entre o tratamento de raízes de *Q. grandiflora* com Al x controle (sem Al) e entre as replicatas biológicas. Observe o agrupamento entre as replicatas biológicas (círculos) e o distanciamento entre os tratamentos. Agrupamento amarelo (à direita): controle; agrupamento azul (à esquerda): tratamento com Al.

O teste ANOVA selecionou as proteínas que apresentaram abundância com diferenças significativas entre os grupos. Dessa forma, proteínas diferencialmente abundantes foram agrupadas em clusters conforme seu perfil de abundância nas condições estudadas (Figura 11).



**Figura 11.** Proteínas reguladas agrupadas em *clusters* conforme seu perfil de abundância para cada condição testada. Teste ANOVA para seleção das proteínas que apresentaram abundância com diferenças significativas entre os tratamentos (Al x Controle) ( $p \leq 0,05$ ).

## **6.6. Proteínas diferencialmente abundantes em raízes de *Q. grandiflora***

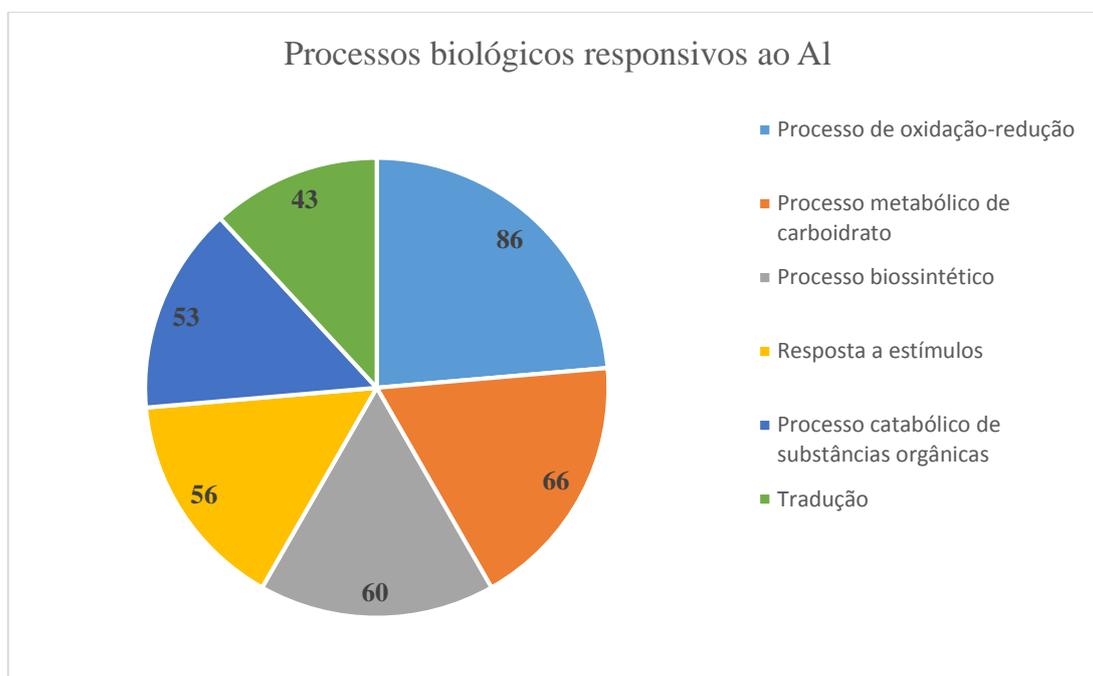
Como mencionado, nas amostras de raízes de *Qualea* foram identificadas 2520 proteínas totais. Para a identificação de proteínas diferencialmente abundantes foram consideradas aquelas que apresentaram um *fold-change* maior ou igual a 1,5 e um valor-p inferior ou igual a 0,05. Assim, em raízes de *Q. grandiflora* foram identificadas um total de 410 proteínas diferencialmente abundantes após tratamento com Al, quando comparadas com o controle (sem Al).

Adicionalmente, a maioria destas proteínas foram positivamente reguladas, ou seja, 274 proteínas (67%), e, conseqüentemente as restantes 136 (33%) apresentaram uma diminuição na abundância em resposta ao Al. No Anexo 1 é possível observar informações mais completas relacionadas às proteínas como, por exemplo: descrição, número de peptídeos utilizados para a quantificação, valores de *score*, valor de p e *fold change*.

## **6.7. Ontologia gênica de proteínas responsivas ao Al**

Para se determinar quais categorias funcionais responderam ao tratamento com Al, as 410 proteínas diferencialmente abundantes foram classificadas em diversos processos biológicos (Figura 12). Os processos biológicos mais relevantes, assim como as proteínas reguladas, foram detalhadas e discutidas.

As proteínas reguladas foram predominantemente relacionadas à processos de oxirredução (86), processos catabólicos de substâncias orgânicas (53), processos metabólicos de carboidrato (66), processos biossintéticos (60), respostas a estímulos (56), e tradução (43).

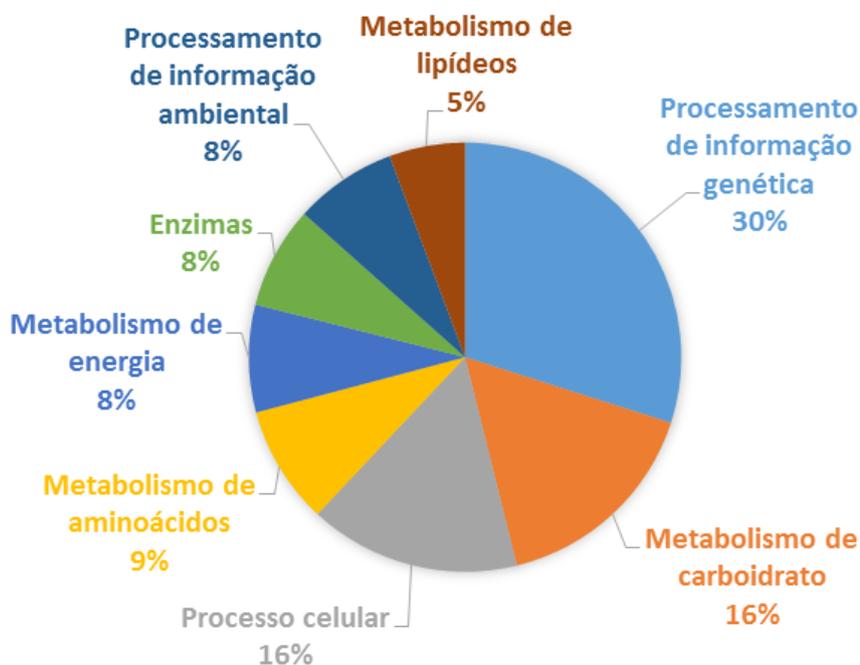


**Figura 12. Distribuição das proteínas diferencialmente abundantes em *Q. grandiflora* em resposta ao Al, de acordo com os processos biológicos em que atuam.** Os números representam a ocorrência de cada termo GO.

### 6.8. Vias metabólicas responsivas ao Al

A fim de determinar quais vias metabólicas foram mais responsivas à presença do Al, foi feito o mapeamento das proteínas diferencialmente abundantes identificadas em raízes de *Q. grandiflora* utilizando a base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Comparando-se com o controle (sem Al), das 410 proteínas diferencialmente abundantes, 272 (66,3%) foram anotadas na base de dados KEGG às quais foram atribuídas a 117 vias metabólicas distintas.

Os resultados mostraram que as proteínas diferencialmente abundantes estavam principalmente envolvidas em vias relacionadas a processamento de informação genética, seguida de metabolismo de carboidrato, processos celulares, metabolismo de aminoácidos, metabolismo energético e lipídeos (Figura 13).



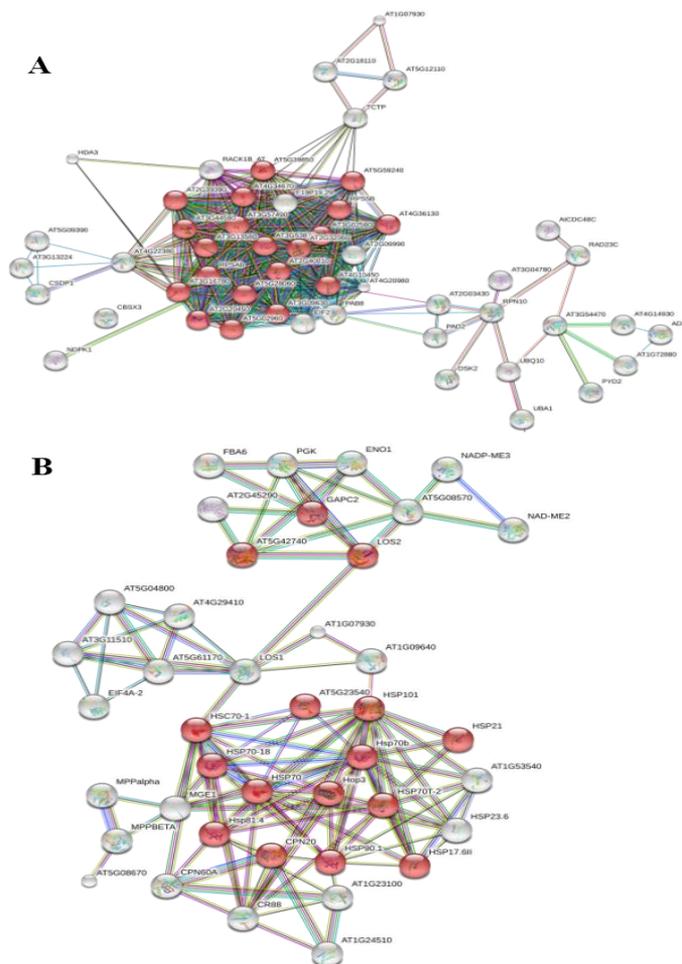
**Figura 13.** Principais categorias das vias metabólicas a partir das proteínas diferencialmente abundantes em raiz de *Q. grandiflora* que responderam ao tratamento com Al, investigadas utilizando-se a base de dados KEGG.

Como o objetivo dessa análise proteômica foi identificar proteínas e vias metabólicas envolvidas na resposta ao Al em raízes de *Q. grandiflora*, assim como os mecanismos associados, procedeu-se a análise do enriquecimento das vias metabólicas reguladas. Portanto, esse procedimento foi obtido por meio da base de dados STRING (Anexo 2).

Assim, as vias metabólicas mais relevantes foram evidenciadas e indicaram que as proteínas com abundância diferenciada estavam principalmente envolvidas no metabolismo do glicoxilato (N= 8), na fosforilação oxidativa (N= 5), na degradação de ácidos graxos (N= 7), no metabolismo de purina e pirimidina (N= 12) e metabolismo de metionina e cisteína (N= 6) e também em atividade ribossomal (N= 21). Essas vias, assim como as proteínas reguladas, foram detalhadas e discutidas (Anexos 3 - 8).

## 6.9. Interações entre as proteínas diferencialmente reguladas

Interações proteína-proteína desempenham um importante papel na realização adequada da função celular. Assim, com o propósito de compreender as complexas relações das interações proteicas em raízes de *Q. grandiflora* se utilizou um *score* mais alto (0.900) correspondente a proteínas homólogas do banco de dados de *Arabidopsis thaliana*, por meio da base de dados STRING 10.0. Foi identificada uma rede de interação entre proteínas de família ribossômica envolvendo 21 proteínas cuja abundância foi significativamente aumentada com FDR 1.36e-11 (Figura 14A). A análise STRING também indicou proteínas diferenciais com abundância significativamente diminuída e se observou uma forte interação em resposta a estresses. Esta rede de interação envolveu 31 proteínas, em sua maioria HSPs (*heat shock proteins*) com FDR 1.07e-05 (Figura 14B).



**Figura 14. Análise de interação proteína-proteína baseada no STRING com um *score* de confiança de interação (0.900).** (A) Análise STRING para proteínas diferencialmente abundantes *up* reguladas em *Q. grandiflora* após tratamento com AI. Os nós destacados em vermelho são proteínas de família ribossômica. (B) Análise STRING para proteínas diferencialmente abundantes *down* reguladas em *Q. grandiflora* após tratamento com AI. Os nós destacados em vermelho são proteínas relacionadas à resposta a estresse.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Al foi benéfico para o crescimento e desenvolvimento de *Qualea grandiflora*

Tem sido observado que algumas espécies de plantas são altamente tolerantes ao Al e capazes de acumular altas quantidades desse metal em diversos órgãos sem apresentar sintomas de toxicidade. Por exemplo, *Vochysia thyrsoidea* Pohl, *Miconia fallax* DC, *Qualea multiflora* Mart. e *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Haridasan *et al.*, 2008; Delhaize *et al.*, 2012). Também, esse é o caso de *Q. grandiflora*. Essas plantas quando cultivadas na presença de Al, além de não apresentar sintomas de toxicidade, tiveram o seu crescimento e desenvolvimento estimulados durante o período observado (Haridasan *et al.*, 2008; Silva, 2012; Melo, 2016). Este fato sugere que Al é necessário para o crescimento e desenvolvimento de *Q. grandiflora* e que sua ausência afeta negativamente processos metabólicos e bioquímicos com reflexos no desenvolvimento da planta.

O presente trabalho comparou alterações quantitativas induzidas pelo Al no proteoma de raízes de plantas de *Q. grandiflora*. Ficou claro que a presença de Al induziu alterações proteicas que refletiram na regulação e abundância de proteínas envolvidas em diversos processos biológicos e metabólicos. Este conhecimento será de grande importância para se compreender melhor os mecanismos moleculares dessas plantas para lidar com esse metal.

### 7.2. Suplementação de Al promoveu o crescimento de raízes de *Q. grandiflora*

Um sistema radicular verdadeiro consiste em raízes primárias e raízes secundárias (laterais), e a toxicidade do Al é conhecida por causar nanismo de todo esse sistema radicular de plantas sensíveis a este metal (Zhou *et al.*, 2016). Após exposição a concentrações mais altas de Al, particularmente  $Al^{3+}$ , em condições de pH ácidos (pH <5,5), as plantas sensíveis desenvolvem um sistema radicular atrofiado e atarracado (Ryan, 1992; Ciamporová, 2002). Em arroz, após 72 h de tratamento com Al, o alongamento das raízes foi inibido 48% e 76%, para as variedades Koshihikari (tolerante)

e Kasalath (sensível), respectivamente (Wang *et al.*, 2013).

No presente estudo, a suplementação de Al estimulou o crescimento de *Q. grandiflora* ao longo de 90 dias de observação. A presença desse metal induziu o desenvolvimento radicular e foliar nas plantas de *Qualea* tratadas, enquanto nas plantas controle (sem Al) as folhas apresentaram clorose (Figura 7) e raízes menos espessas e menores (Figura 8B). Estes resultados confirmam estudos anteriores de que o Al é benéfico para o crescimento de plantas de *Q. grandiflora* (Haridasan *et al.*, 2008; Silva, 2012; Melo, 2016).

Zhou e colaboradores (2016) analisaram imagens de raízes para identificar características da arquitetura do sistema radicular de tomateiro cultivado com e sem Al. Verificou-se que o sistema radicular dessas plantas sob a condição de tratamento com Al tiveram as raízes principais um pouco mais espessas e raízes laterais menores e mais curtas por planta (Zhou *et al.*, 2016). Por outro lado, as plantas não tratadas apresentaram uma área de superfície das raízes maiores que aquelas crescidas com Al. Ao contrário do que se tem observado em *Qualea*, onde as raízes das plantas controle (sem adição de Al) que apresentaram pouca, ou nenhuma ramificação lateral comparado com aquelas suplementadas com o metal.

A formação de raízes laterais é iniciada quando as células do periciclo entram novamente no ciclo de divisão celular em resposta à elevada concentração local de auxina (Marhavý *et al.*, 2013). Além disso, tem-se determinado que estresses afetam negativamente a formação de raízes laterais pela liberação de fitormônios inibidores de crescimento como o ácido abcísico (ABA) e o etileno (Jung & McCouch, 2013). Esses dados são consistentes com o observado em raízes de tomateiro tratadas com Al (Zhou *et al.*, 2016). Nessa planta, duas proteínas na via de biossíntese de ABA foram induzidas, assim como proteínas oxoglutaratos e oxigenases da rota de formação do etileno (Zhou *et al.*, 2016). Diferentemente, em *Q. grandiflora* nenhuma proteína relacionada a biossíntese desses fitormônios (ABA/etileno) foi identificada em raízes crescidas com Al, indicando que o metal não é um agente estressante a essa planta.

### 7.3. Proteínas da parede celular foram induzidas em resposta ao Al

Os mecanismos associados à resposta ao Al ainda não são claramente compreendidos. Uma vez que o Al pode interagir com várias estruturas extra e intracelulares, diversos mecanismos têm sido propostos em resposta a esse metal, incluindo a modificação da parede celular (Kochian *et al.*, 2005). A parede celular é o primeiro local a perceber as condições de estresses externos e iniciar o processo de exclusão de Al em plantas resistentes. Neste estudo, 24 proteínas relacionadas à parede celular foram responsivas e tiveram sua abundância aumentada em raízes de *Q. grandiflora* crescidas com Al (Anexo 9). Estes resultados indicam que o aumento da abundância de proteínas relacionados a parede celular pode desempenhar papéis importantes em *Q. grandiflora* em resposta ao Al.

Em arroz submetido ao tratamento com Al, 10 proteínas relacionadas a parede celular foram identificadas, sendo que seis tiveram a abundância significativamente alterada na variedade sensível (Kasalath) (Wang *et al.*, 2013). Como a inibição do alongamento da raiz por toxicidade ao Al foi menos acentuada na variedade tolerante (Koshihikari) foi concluído que as alterações na abundância das proteínas relacionadas à parede celular resultaram em mudanças nas propriedades físico-químicas desta estrutura. Esse fato também foi considerado uma resposta importante ao estresse ao Al em arroz, pois o crescimento e expansão celular está diretamente associado com as propriedades físico-químicas da parede (Cosgrove, 2005). Assim, a manutenção da regulação adequada das proteínas que controlam essas propriedades da parede é essencial para o crescimento, não só das raízes, mas de qualquer outro órgão da planta.

Adicionalmente, a parede celular é um local de acúmulo de Al em plantas superiores. Em plantas sensíveis, as pontas das raízes são os sítios primários da toxicidade ao  $Al^{3+}$ , e a maior parte do Al na raiz se encontra na parede celular (Chan *et al.*, 1999; Tabuchi & Matsumoto, 2001). Assim, o acúmulo de Al, por si só, resulta no aumento da rigidez da parede celular através da reticulação de resíduos de pectina que inibe o afrouxamento da parede celular necessário para o crescimento radicular (Tabuchi & Matsumoto, 2001).

Desta forma, o Al parece suprimir a expressão de genes que codificam proteínas da parede celular em plantas sensíveis. Isso difere do que foi observado em *Qualea*. Nesta planta, foi constatado um aumento da abundância de proteínas da parede celular nas plantas crescidas com Al. Conseqüentemente, ao que parece, este metal contribuiu

positivamente para o alongamento das raízes de *Q. grandiflora* (Figura 8A).

Estes achados sugerem que o Al modifica positivamente a regulação dos componentes proteicos da parede celular em *Q. grandiflora*. Entretanto, necessita-se de análises mais específicas para saber o real reflexo das alterações resultantes da abundância diferenciada das proteínas de parede. Análises funcionais poderão revelar os papéis dessas proteínas de parede celular responsivas ao Al em *Q. grandiflora*.

#### **7.4. Proteínas diferencialmente abundantes responsivas ao Al em raízes de *Q. grandiflora* estão associadas a diversos processos biológicos**

O monitoramento das alterações na abundância de proteínas em plantas sob tratamento com Al pode auxiliar na identificação de processos biológicos e componentes moleculares responsáveis pela toxicidade/tolerância a este metal. No presente estudo foram identificadas 410 proteínas diferencialmente abundantes entre raízes de plantas tratadas com Al e o controle (sem Al). Conseqüentemente, em *Q. grandiflora*, a análise proteômica comparativa foi uma ferramenta capaz de identificar proteínas/enzimas associadas a processos biológicos de grande importância para o crescimento dessa planta. Assim, diversas proteínas envolvidas com processos de oxirredução, metabolismo de carboidrato, catabolismo de substâncias orgânicas, tradução, entre outros, foram identificadas em *Qualea* em resposta ao Al (Figura 12).

A grande variedade de processos responsivos à presença de Al demonstra a complexidade do processo de tolerância e acúmulo de Al em plantas. Adicionalmente, as variações na quantidade e diversidade de proteínas reguladas afetam diretamente os tipos de processos biológicos ativados/desativados. Além disso, todas essas variações também são dependentes da espécie de planta. A maior parte dos estudos sobre este tópico têm sido realizados com espécies vegetais de interesse agrônomo como arroz, citrus, tomateiro e sorgo (Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017).

Por exemplo, numa variedade de tomate (Micro-Tom) sensível ao Al foram encontradas variações na abundância de proteínas associadas com atividade de transcrição, tradução e transdução de sinal quando expostas ao Al (Zhou *et al.*, 2016). Entretanto, com respeito a plantas nativas não existem estudos em nível molecular sobre a resposta dessas plantas ao metal. Contudo, as análises do proteomas de raízes de *Q. grandiflora* revelaram que os processos moleculares responsivos ao Al tiveram várias

proteínas identificadas que, com base na abundância, foram classificadas como "significativamente alteradas" entre os tratamentos (Al x controle). Consequentemente, essas proteínas diferencialmente abundantes foram associadas a diversos processos biológicos. Dentre esses processos biológicos estão inclusos alguns pertencentes ao metabolismo primário como: metabolismo de ácidos orgânicos, processos biossintéticos e processos catabólicos. É importante salientar que as proteínas responsivas ao Al podem ter tido sua abundância aumentada ou diminuída dentro de um mesmo processo biológico. Esses resultados sugerem que alterações dinâmicas das proteínas em resposta ao tratamento com Al podem ser um fator crucial para essas plantas se beneficiarem da presença desse metal.

Existem indicativos que as respostas das plantas ao Al têm alto grau de especificidade. Assim, em raízes de *Arabidopsis*, uma análise transcriptômica comparativa dos efeitos rizotóxicos de íons como Al, Cd e Cu indicou que as alterações na expressão de genes em resposta ao Al resultaram na ativação de processos biológicos específicos (Zhao *et al.*, 2009). Portanto, em *Arabidopsis* existe um conjunto de reações fisiológicas que são Al-específicas e não são replicadas por outros elicitores metálicos.

Adicionalmente, em raízes de soja (*Glycine max*), sob estresse de Al, várias proteínas associadas a estresse/defesa foram caracterizadas, assim como outras envolvidas na transdução de sinal, transporte, enovelamento proteico, regulação gênica e processos metabólicos primários (Zhen *et al.*, 2007). Todos esses processos foram considerados críticos para a sobrevivência da planta sob a toxicidade de Al (Zhen *et al.*, 2007). Entretanto, em *Qualea* algumas proteínas foram associadas com respostas a estímulos (bióticos/abióticos), já que o Al não causa estresse a essa planta.

Também em hortênsia (*Hydrangea macrophylla*), após o tratamento com Al, a análise dos termos GO (ontologia gênica) mostrou que as categorias de processos biológicos predominantes estavam relacionadas à morte celular programada, processos do sistema imunológico e resposta a estímulos bióticos/abióticos (Chen *et al.*, 2015). Diferentemente, em *Q. grandiflora* não foi observada a presença de proteínas associadas à morte celular programada e a processos do sistema imunológico, mas sim, a processos biossintéticos ativos, regulação do metabolismo de carboidratos e ácidos orgânicos.

Em sorgo (*Sorghum bicolor*), após o tratamento de duas linhagens, uma tolerante e outra sensível, com Al foi observado um grande aumento no número de proteínas positivamente reguladas envolvidas em processos celulares, metabólicos e biossintéticos básicos na variedade tolerante (Zhou *et al.* 2017). Semelhantemente, os resultados obtidos

em *Q. grandiflora* em resposta ao Al também mostrou alterações expressivas de diversos processos metabólicos primários como metabolismo de ácidos orgânicos e processos biossintéticos.

Os estudos mencionados acima indicam que, em plantas cultivadas, as principais alterações metabólicas em resposta ao Al estão relacionadas com respostas a estresses. Porém, em *Q. grandiflora* a exposição ao Al resultou em alterações na abundância de proteínas responsáveis pela manutenção/regulação do metabolismo da planta sugerindo que este metal desempenha um relevante papel metabólico nessa espécie.

Como mencionado, as alterações metabólicas induzidas pelo Al foram examinadas em plantas como trigo (Hamel *et al.*, 1998), *Arabidopsis* (Richards *et al.*, 1998; Kumari *et al.* 2008; Goodwin & Sutter 2009) e arroz (Mao *et al.*, 2004; Yamaji *et al.* 2009; Tsutsui *et al.* 2012). Desta forma, os resultados obtidos em *Q. grandiflora* vêm agregar informações, em nível molecular, das respostas metabólicas ao Al em plantas nativas. Consequentemente, esses dados expandirão o conhecimento sobre a importância desse metal em plantas acumuladoras que, talvez, possa ser aplicado a outras espécies. Além disso, as informações obtidas por meio dessas análises podem viabilizar a prospecção de genes possibilitando o melhoramento genético e a produção de plantas cultivadas mais resistentes ao Al.

#### **7.4.1. Abundância de enzimas relacionadas à capacidade oxirredutora em raízes de *Q. grandiflora* suplementadas com Al**

Em *Q. grandiflora* foram identificadas diversas proteínas envolvidas em processos de oxirredução. Quando se compara com o tratamento controle (sem Al), observou-se que 58 e 27 proteínas associadas a processos de oxirredução tiveram a abundância respectivamente aumentada e diminuída (Anexo 10). Como exemplo, a proteína formato desidrogenase (FDH), positivamente regulada em *Q. grandiflora*, está envolvida em respostas a estímulos bióticos e abióticos em *Arabidopsis* (Lou *et al.*, 2016) e é responsável pela catálise da reação de oxidação do formato a bicarbonato. Em *Arabidopsis* essa enzima teve sua abundância aumentada na presença de Al. De acordo com Lou *et al.* (2016), em *Vigna umbellata* esta enzima confere maior tolerância ao Al<sup>+3</sup>. Nessa planta, a rápida acumulação de formato em ápices radiculares após tratamento com

esse metal foi considerada como forte evidência de tolerância ao metal. Além disso, o  $Al^{+3}$  foi o indutor da expressão de *VuFDH* em *V. umbellata* (Lou *et al.* 2016).

A FDH é uma enzima versátil frequentemente associada à resposta a mudanças ambientais (Jormakka *et al.*, 2003). Este fato é consistente com o que foi observado em *Q. grandiflora*. Contudo, neste caso específico, o Al pode ser considerado um estímulo ambiental, mas não um agente estressante. A presença de proteínas similares a esta pode ter sido um fator de relevância no processo adaptativo de plantas como *Q. grandiflora* aos solos ácidos do Cerrado.

Outro grupo de proteínas que em *Qualea* tiveram sua abundância significativamente alterada em resposta ao Al foi o de enzimas antioxidantes. No caso de *Q. grandiflora* essas enzimas, na sua maioria, tiveram sua abundância diminuída. Por outro lado, foi observado em raízes de tomateiro sensível expostas ao Al (Zhou *et al.*, 2016). Nesta planta, as proteínas monodeidroascorbato redutase (MDHAR), superóxido dismutase (SOD), e selênio-proteínas (não encontrada em *Qualea*) todas com funções oxirredutases, além da proteína dissulfeto isomerase (PDI) que atua na reparação de proteínas desnaturadas (Cho *et al.*, 2011) foram reguladas positivamente. Similarmente, em arroz, uma das culturas mais tolerantes ao Al, as proteínas associadas com atividades antioxidantes SOD, GST (glutathione S-transferase) e S-adenosilmetionina sintetase 2 (SAMS) são consistentemente induzidas por Al (Yang *et al.*, 2007).

Diferentemente do observado em tomateiro e arroz, em *Q. grandiflora*, a abundância de enzimas antioxidantes como SOD, MDHAR e PDI, assim como uma GST, uma quinona oxidoreductase-like e uma aldeído desidrogenase foi significativamente diminuída. Ao que parece, as proteínas relacionadas a processos de oxirredução são aumentadas tanto em plantas cultivadas sensíveis quanto tolerantes em resposta ao Al, indicando que pode ser uma reação ao estresse elicitado por este metal. Diferentemente, muitas proteínas desse grupo foram suprimidas em *Q. grandiflora*.

Conclui-se que a capacidade de *Q. grandiflora* responder positivamente à presença de Al está relacionada com o aumento da abundância de proteínas relacionadas a vários processos. Portanto, pode-se inferir que a tolerância ao Al é um fenômeno complexo envolvendo múltiplas proteínas e processos biológicos distintos ainda não completamente caracterizados.

### **7.5. O Al atuou diretamente no metabolismo primário de plantas de *Q. grandiflora***

Para um melhor entendimento das vias metabólicas que são ativadas em raízes de *Q. grandiflora* sob a influência do Al foi feita uma análise na base de dados KEGG das proteínas identificadas que foram diferencialmente reguladas. Desta forma, as vias metabólicas responsivas ao Al em raízes de *Q. grandiflora* que tiveram as maiores diferenças em termos de abundância proteica, assim como aquelas que têm maior relevância no crescimento e desenvolvimento da planta podem ser enquadradas nas seguintes categorias: metabolismo de carboidratos, metabolismo energético, metabolismo lipídico, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de nucleotídeos e tradução. Dentro dessas categorias metabólicas, as principais vias enriquecidas e mapeadas que apresentaram maior aumento de atividade foram vias relacionadas a: Metabolismo do glicoxilato; Fosforilação oxidativa; Degradação de ácidos graxos; Metabolismo de purina e pirimidina; Metabolismo de metionina e cisteína e Atividade ribossomal.

Em plantas acumuladoras tem sido constatado um aumento da atividade de processos relacionados ao metabolismo de aminoácidos, ácidos nucleicos e traducional. Por exemplo, em raízes de hortênsia (*Hydrangea macrophylla*), uma planta acumuladora de Al, as proteínas putativas reguladas após tratamento com Al incluíram as seguintes categorias de vias: modificação pós-traducional, chaperonas, transporte e metabolismo de aminoácidos, e transporte e metabolismo de carboidratos (Chen *et al.*, 2015). Já em folhas da mesma planta, três grupos se destacaram: "tradução, estrutura ribossômica e biogênese", "mecanismos de transdução de sinal" e "transporte e metabolismo de carboidratos" (Chen *et al.*, 2015). Observe que boa parte dos processos metabólicos ativados são coincidentes entre *Qualea* e hortênsia.

### 7.5.1. Al regulou o metabolismo de ácidos orgânicos de *Q. grandiflora*

Ácidos orgânicos como o oxalato e o citrato têm sido frequentemente envolvidos no processo de tolerância e acúmulo de Al em várias plantas, como por exemplo o trigo e o trigo sarraceno (Delhaize *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2001, Yokosho *et al.*, 2014). Em plantas existem três vias para a biossíntese de oxalato: a via do glioxilato, a via do ascorbato e a via do oxaloacetato (Franceschi *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2010). Em arroz, o glioxilato foi um eficiente precursor para a biossíntese de oxalato, e este pode ser produzido durante reações de fotorrespiração ou ciclo de glioxilato (Yu *et al.*, 2010). Tendo em vista que o processo de fotorrespiração está diretamente associado à fotossíntese em plantas C<sub>3</sub>, este processo não será considerado como fator relevante da síntese de oxalato em raízes de *Qualea*.

Em raízes de *Q. grandiflora*, o metabolismo de glioxilato teve a abundância de proteínas aumentada tais como MDH1 e MDH2 (malato desidrogenase 1 e 2), formato desidrogenase (FDH), catalase (CAT), acetil-CoA C-acetiltransferase (atoB), serina hidroximetiltransferase (SHMT) e sistema de clivagem da glicina H (GCSH) em resposta ao tratamento com Al. Estes resultados sugerem que a biossíntese de oxalato em raízes de *Q. grandiflora* crescidas com Al está ativa e pode auxiliar na captura e acúmulo deste metal nesta planta (Anexo 3).

É importante salientar que existem muitos estudos que relacionam o oxalato e quelação de Al. Tem-se mostrado que o oxalato é capaz de quelar o Al trivalente (Al<sup>3+</sup>) e formar um complexo estável com este íon, e, conseqüentemente, anular o seu efeito tóxico, tanto externamente (na rizosfera) quanto internamente nos tecidos da raiz (Ma, 2000; Ma *et al.*, 2001; Yokosho *et al.*, 2014). Em trigo sarraceno, uma espécie com alta tolerância e acumuladora de Al, se a secreção de oxalato for suprimida por um inibidor de canal aniônico, e. g. o fenilglioxal, o alongamento da raiz é inibido na presença de Al (Zheng *et al.*, 1998, Klug & Horst, 2010).

Adicionalmente, em hortênsia, também uma acumuladora de Al, a secreção de oxalato e genes associados à via do glioxilato (isocitrato liase e SHMT) foram regulados positivamente em raízes após exposição ao Al (Chen *et al.*, 2015). Este fato é consistente com o que foi observado em *Q. grandiflora* onde também ocorreu um aumento da abundância de SHMT em resposta a este metal.

Como mencionado, tanto em *Q. grandiflora* quanto em trigo sarraceno e hortênsia

foram observados aumentos de abundância de várias enzimas desta rota do glioxilato (Ma *et al.*, 1997). Nessa última, genes codificando MDH e SHTM também tiveram sua expressão aumentada (Ma *et al.*, 1997). Ao que parece, o aumento da biossíntese de oxalato em plantas acumuladoras de Al é um componente *default* na resposta e acúmulo de Al. Contudo, no caso de *Q. grandiflora* não existem estudos fisiológicos sobre a função desses ácidos orgânicos nas raízes. Assim, embora a abundância de proteínas envolvidas com a biossíntese de ácidos orgânicos tenha sido aumentada nas raízes de *Qualea*, será preciso determinar qual a função desses compostos neste órgão, assim como, se esses ácidos orgânicos são liberados na rizosfera.

Quanto ao citrato, este é sintetizado através do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), também conhecido como ciclo de Krebs, que ocorre nas mitocôndrias. Em *Q. grandiflora* suplementada com Al foram identificadas sete proteínas com abundância aumentada envolvidas no ciclo TCA, a saber: MDH1, MDH2, IDH1-2, IDH3, PDHB, LSC1 e LSC2. Além destas com abundâncias aumentadas, observou-se quatro proteínas deste ciclo que tiveram sua abundância diminuída (DLD, DLAT, DLST e ACO) em raízes de *Qualea* expostas ao Al.

Observações em raízes de trigo sarraceno mostraram que os genes codificando enzimas do TCA, como CS, ACO, DLST, SDH e MDH tiveram maior abundância de transcritos quando expostas ao Al (Yokosho *et al.*, 2014). Diferentemente, SDH e MDH, isoformas distintas daquelas mencionadas acima, tiveram a quantidade de transcritos diminuída em trigo sarraceno crescidas com o metal (Yokosho *et al.*, 2014). É importante salientar que tanto o trigo sarraceno quanto *Qualea* são acumuladoras de Al e que tiveram respostas distintas na regulação dos genes associados ao TCA. Em *Qualea*, a abundância de ACO e DLST decresceu e em trigo sarraceno aumentou. Por outro lado, a enzima MDH teve sua regulação aumentada na espécie nativa, enquanto que em trigo foi suprimida (Yokosho *et al.*, 2014). Esses dados sugerem que a síntese de citrato via TCA pode variar entre as espécies. Além disso, o TCA é um ciclo de grande importância para inúmeras rotas metabólicas que a real razão de um conjunto específico de enzimas ser aumentado ou suprimido seja de difícil compreensão. Para se determinar se em *Q. grandiflora* a síntese de citrato está superativa serão necessários estudos metabólicos que permitam a quantificação desse composto nessa planta.

Adicionalmente, em raízes de hortênsia, também uma planta Al-acumuladora, exceto para CS (citrato sintase) e MDH, outros genes envolvidos no ciclo TCA não tiveram suas expressões alteradas pelo Al (Chen *et al.*, 2015). Segundo esses autores, isto

é um indicativo de que a biossíntese de citrato não foi crítica para a resposta ao Al nessa planta. Como visto, a síntese de citrato pode variar entre espécies acumuladoras.

É fato que a abundância de transcritos e proteínas relacionados com a via TCA diferiu bastante entre os estudos mencionados, indicando que a regulação deste ciclo tem grande variação entre as espécies. Por isso, pode-se supor que o aumento na abundância de proteínas dessa via pode ser relacionado a outros processos metabólicos importantes. Como exemplo se pode citar a produção de energia via respiração celular em razão de uma maior demanda energética para atender as necessidades de crescimento e desenvolvimento da planta. Essa ponderação parece ser viável para *Qualea*, visto que as plantas crescidas com Al se desenvolvem melhor (Haridasan *et al.*, 2008; Silva, 2012; Melo, 2016).

#### **7.5.2. A abundância de enzimas associadas à degradação de ácidos graxos foi alterada em raízes de *Q. grandiflora* na presença de Al.**

A análise comparativa de proteínas diferencialmente abundantes em resposta ao Al mostrou que, em raízes de *Q. grandiflora*, 20 proteínas envolvidas com o metabolismo de lipídeos tiveram sua abundância aumentada em resposta ao Al. Uma análise KEGG mostrou que as vias de degradação de ácidos graxos foram significativamente enriquecidas (Anexo 5). Assim, as seguintes proteínas associadas à degradação de ácidos graxos que tiveram sua abundância aumentada foram: ADH5 (álcool desidrogenase), ACOX (acil-CoA oxidase), atoB (acetil-CoA C-acetiltransferase), ACAA1 (acetil-CoA C-aciltransferase 1), MFP2 (enoil-CoA hidratase/3-hidroxiacil-CoA desidrogenase) e ADH1 (álcool desidrogenase classe-P).

Consistentemente com o observado em *Q. grandiflora*, em hortênsia (*H. macrophylla*), também acumuladora de Al, uma análise KEGG mostrou que o “metabolismo de lipídeos” foi significativamente enriquecido em raízes e folhas em resposta a este metal (Chen *et al.*, 2015.). Assim, a presença de Al aumenta a abundância de proteínas associadas ao metabolismo lipídico em hortênsia, o que pode interferir com funções da membrana plasmática (Chen *et al.*, 2015). Além disso, acredita-se que a ativação dessa via metabólica nessas plantas possa servir como fonte de energia para manutenção do metabolismo da planta.

Como organismos eucarióticos, as plantas requerem lipídeos para a biogênese de

suas membranas, também como moléculas de sinalização, e como uma forma de carbono e energia armazenados (Schmid & Ohlrogge, 2002). Vale mencionar que uma análise de vários mutantes de *A. thaliana* tem revelado funções essenciais para a degradação dos ácidos graxos de reserva durante a germinação da semente e o crescimento e desenvolvimento desta planta (Poirier *et al.*, 2006; Goepfert & Poirier, 2007).

Com base nos resultados mencionados, o aumento da abundância de proteínas (enzimas) envolvidas na degradação de ácidos graxos em *Q. grandiflora* poderia desempenhar funções importantes como a geração de energia metabólica e sinalização durante o crescimento e desenvolvimento dessas plantas.

### **7.5.3. Metabolismo de nucleotídeos e aminoácidos em resposta ao Al**

Proteínas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos também tiveram abundância diferenciada em resposta ao Al em raízes de *Q. grandiflora*. Neste tópico, observou-se quatro proteínas associadas ao metabolismo de purinas, cuja abundância foi significativamente aumentada e duas diminuídas em resposta a esse metal. Com relação ao metabolismo de pirimidinas, cinco proteínas foram encontradas com abundância aumentada em raízes de *Qualea* tratadas com Al (Anexo 6).

Sabe-se que o Al tem uma forte afinidade de ligação a compostos doadores de oxigênio tais como fosfato inorgânico, nucleotídeos, RNA, DNA e proteínas (Martin, 1988). Segundo Ma (2000) a ligação do Al com estas substâncias pode resultar em danos estruturais, principalmente em raízes, visto que este órgão é o primeiro a ter contato com Al. Portanto, se um ligante que estiver presente se ligar fortemente ao Al, poderia reduzir a atividade dos íons de Al livres na solução e reduzir qualquer ligação às células da raiz. Contudo, esse não parece ser o caso em *Qualea*. Os resultados vistos nessa planta sugerem que o aumento no metabolismo de nucleotídeos, seja, provavelmente, para atender às demandas de síntese de ácidos nucleicos durante o crescimento da planta.

A cisteína é um aminoácido precursor da biossíntese de S-adenosilmetionina (SAM) cujo passo final é catalisado por S-adenosilmetionina sintase (SAMS) (Yang *et al.*, 2007). SAM é um produto da reação enzimática a partir ATP e metionina catalisada por SAMS. A regulação dessa enzima (SAMS) em *Q. grandiflora* sob tratamento com Al diferiu daquilo que foi observado em plantas de arroz sensíveis a este metal (Wang *et al.*, 2013). Nas plantas de arroz (variedade Kasalath), essa enzima teve sua regulação diminuída sob

estresse ao Al (Wang *et al.*, 2013). Adicionalmente, em centeio e arroz, os transcritos e/ou níveis proteicos de SAMS também diminuíram em resposta ao estresse de Al (Milla *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013).

Em *Qualea*, além de SAMS as enzimas MDH1, MDH2, asd (aspartato semialdeído desidrogenase), e AGXT2 (alanina-glioxilato transaminase) também tiveram sua abundância aumentada. Na análise KEGG em *Qualea*, essas enzimas também foram associadas ao metabolismo de metionina e cisteína (Anexo 7). Portanto, as contribuições do metabolismo de aminoácidos para o desenvolvimento de *Q. grandiflora* parecem ser regulados positivamente na presença de Al.

#### **7.5.4. Atividade ribossomal**

Em plantas de *Q. grandiflora*, dentro do processamento de informação genética a etapa que mais se destacou foi a tradução, mais especificamente a via ribossomal. Foi observado que 22 proteínas ribossômicas tiveram sua abundância aumentada na presença de Al (Anexo 8). Esse fato pode indicar que o processo de divisão celular, assim como o metabolismo geral da planta estão funcionando de forma adequada nas plantas suplementadas com Al.

Biamonti e Caceres (2009) observaram que agentes elicitores de estresses levam a um bloqueio imediato de todos os processos metabólicos importantes, o que inclui replicação de DNA, transcrição, exportação de mRNA e tradução. No entanto, em *Q. grandiflora* o processo de síntese proteica foi regulado para cima, pois todas as proteínas ribossomais tiveram sua abundância significativamente aumentada após tratamento com Al (Anexo 11). Esse fato vai na direção oposta ao verificado em plantas sob estresse.

Logo, os resultados indicam que o mecanismo de biossíntese de proteínas foi positivamente afetado pelo tratamento com Al, corroborando com a hipótese de que este metal não é um elemento estressante à *Q. grandiflora*.

### 7.5.5. Fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é uma etapa da respiração celular que usa energia liberada da oxidação de nutrientes para produzir ATP. A respiração é essencial para a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento dos seres vivos.

Sendo assim, proteínas associadas ao metabolismo energético tiveram sua abundância aumentada em *Q. grandiflora* em resposta à presença de Al. Conseqüentemente, nesta planta foi constatado que cinco proteínas relacionadas à etapa respiratória da fosforilação oxidativa reguladas positivamente, a saber: ATP sintase subunidade mitocondrial, NADH desidrogenase ubiquinona Fe-S 1, *V-type proton ATPase catalytic subunit A*, NADH desidrogenase [ubiquinona] Fe-S 2 mitocondrial, NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 subcomplexo da subunidade 2 alfa (Anexo 4).

As plantas exigem um alto nível de ATP que é usado como fonte de energia para o crescimento, desenvolvimento e também em respostas a todo tipo de estímulo biótico e abiótico, incluindo o estresse a metais (Li *et al.*, 2013). Contudo, não parece que *Q. grandiflora* esteja sob estresse na presença de Al, portanto, com respeito a essa planta, é mais coerente supor que a energia respiratória esteja sendo usada em processos de crescimento e desenvolvimento.

As análises das proteínas responsivas ao Al em raízes de *Q. grandiflora* revelaram uma intrincada rede de conexões que englobam as alterações de abundância de proteínas e as diversas vias metabólicas responsivas ao Al. Assim, percebe-se a complexidade do objeto deste estudo tanto no aspecto fisiológico quanto sobre os mecanismos moleculares de resposta ao Al nessa planta. Desta forma, os dados deste estudo certamente expandirão o conhecimento sobre a função metabólica do Al em plantas nativas e poderão possibilitar novas ferramentas para o melhoramento genético de plantas resistentes ao Al.

É importante salientar que os resultados observados em *Qualea* indicam que o Al não é fator de estresse para essa planta. Além disso, essa espécie necessita desse metal e deve possuir mecanismos eficazes e diferenciados para metabolizar o Al em seu benefício. Entretanto, mais estudos devem ser realizados com plantas acumuladora nativas, a fim de produzir dados comparáveis com os produzidos a partir da análise proteômica comparativa em raízes de *Q. grandiflora* tratadas com Al.

Em resumo, essa tolerância de *Q. grandiflora* ao Al pode estar relacionada a vários fatores, que incluem: a) aumento da regulação do metabolismo energético, b) aumento da

regulação do metabolismo de aminoácidos, c) aumento da regulação do metabolismo de lipídeos, e d) melhoramento significativo da capacidade total de processamento de informação genética principalmente relacionada a processo de tradução.

Estes resultados forneceram informações valiosas sobre o mecanismo molecular de plantas nativas em resposta ao Al e expandiram a nossa caixa de ferramentas para o melhoramento genético de plantas cultivadas mais resistentes ao Al.

Em conclusão, a nossa análise de dados proteômicos revelou que existem mecanismos comuns e distintos para a tolerância e acumulação de Al em raízes de *Q. grandiflora*, quando comparadas a outras plantas. Embora os papéis exatos de proteínas candidatas não tenham sido ainda examinados, nossos dados fornecem uma plataforma para análise funcional adicional dessas proteínas.

#### **7.6. Análise de interações proteicas revelam duas principais interações em resposta ao Al em raízes de *Q. grandiflora***

A maioria das proteínas estão, em algum momento do tempo de vida de uma célula, envolvidas na formação de complexos com múltiplos parceiros de interação (Alberts, 1998). No presente estudo, a análise de interação proteína-proteína com STRING mostrou interações únicas entre famílias de proteínas ribossomais que foram diferencialmente aumentadas em raízes de *Q. grandiflora* (Figura 14A). Este fato indica que a biossíntese de proteínas permaneceu ativa nas raízes de *Q. grandiflora* tratadas com Al. Além disso, a manutenção da síntese de proteínas ativa sugere que o Al não tem efeitos tóxicos em plantas de *Q. grandiflora* ao lidar com o metal e pode até mesmo ter uma função metabólica relevante nessa planta.

Comparativamente, em variedade de sorgo tolerante ao Al esta interação entre famílias de proteínas ribossomais também foi detectada e envolveu 87 proteínas (Zhou *et al.*, 2017). Tais interações de proteínas ribossômicas diferencialmente abundantes também indicaram que a variedade de sorgo tolerante ao Al (SC566) manteve a atividade de síntese de proteínas viável, o que não se verificou em variedades sensíveis como a BR0075. Assim, sob estresse de Al, plantas de sorgo não tolerantes podem ter tido a atividade de síntese proteica comprometida (Zhou *et al.*, 2017).

A análise STRING também indicou que *heat shock proteins* (HSPs), que são proteínas envolvidas na resposta a estresses abióticos, diferencialmente reguladas em

raízes de *Q. grandiflora*, mostraram uma forte interação (Figura 14B). Em *Qualea* todas as HSPs foram significativamente diminuídas em resposta ao tratamento com Al. Diferentemente, em raízes de cultivares de soja tolerantes ao Al, o metal induziu a produção dessas proteínas (Zhen *et al.*, 2007). Embora em soja a capacidade de resposta ao estresse do Al tenha sido aumentada, parece que em *Qualea* esse mecanismo de resposta permaneceu inativo mesmo na presença deste metal. Esses resultados indicam que o Al não é um agente elicitador de estresse em *Q. grandiflora*.

## 8. CONCLUSÃO GERAL

Os dados obtidos com o presente estudo fornecem uma nova perspectiva sobre as respostas de Al em uma planta acumuladora nativa, *Q. grandiflora*, e as conclusões deste estudo podem ser resumidas da seguinte forma:

- Este é o primeiro estudo a identificar e quantificar 2.520 proteínas em raízes de *Q. grandiflora*, utilizando uma abordagem proteômica *shotgun label-free*;
- As análises do presente trabalho sugerem que o Al é um importante elemento para o crescimento e desenvolvimento de *Q. grandiflora*. No período experimental de 90 dias notou-se alteração morfológica nas raízes e folhas de *Q. grandiflora*, onde as plantas controle (sem Al) que se mostraram estressadas ao se desenvolverem menos sem a suplementação do metal;
- Os resultados obtidos no presente estudo fornecem informações valiosas sobre o mecanismo molecular de plantas nativas acumuladoras em resposta ao Al, e expandiram a nossa caixa de ferramentas, o que pode, talvez, viabilizar o melhoramento genético de plantas cultivadas mais resistentes ao Al;
- A análise de componentes principais (PCA) revelou que o tratamento com Al induziu alterações no proteoma das raízes de *Q. grandiflora*;
- Por meio de análises LC-MS/MS um inventário abrangente de proteínas responsivas ao Al foi estabelecido;
- A análise proteômica quando comparada aos dados da literatura evidenciou que as alterações induzidas pelo Al em *Q. grandiflora* não caracterizaram uma resposta de estresse;
- Análise bioinformática revelou uma ligação entre as alterações da abundância de proteínas e diversas vias metabólicas em resposta ao Al, assim como interações entre essas proteínas diferencialmente reguladas;

- Foi possível identificar muitas proteínas relacionadas a parede celular, metabolismo de carboidrato, catabolismo de substâncias orgânicas, oxirredução, tradução e resposta a estímulos diferencialmente abundantes em resposta ao Al;
- As principais vias metabólicas reguladas em resposta a presença do Al foram associadas a metabolismo do glioxilato, fosforilação oxidativa, degradação de ácidos graxos, metabolismo de purina e pirimidina, metabolismo de metionina e cisteína e atividade ribossomal.

## 9. PERSPECTIVAS

- Identificar e quantificar proteínas diferencialmente abundantes em folhas de *Qualea grandiflora* tratadas com e sem Al;
- Combinar os resultados deste estudo com os dados de transcriptoma de raízes de *Q. grandiflora* (em andamento);
- Realizar estudos proteômicos com outras plantas acumuladoras de Al do Cerrado, pertencentes a outros gêneros e famílias;
- Analisar o efeito do Al sobre as propriedades mecânicas e químicas da parede celular em raízes de *Q. grandiflora*;
- Analisar a concentração/exsudação de oxalato em raízes de *Q. grandiflora* após tratamento com Al e comparar ao controle (sem Al);
- Depositar os dados obtidos em uma base de dados de domínio público.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. The cell as a collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, 92: 291-294, 1998.
- ALLEN, R. C. Influence of aluminum on the flower color of *Hydrangea macrophylla* DC. Contributions from Boyce Thompson Institute for Plant Research 13: 221-242, 1943.
- ANDRADE, L. R. M.; FRANCO, A. C.; HARIDASAN, M.; BARROS, L. M.G.; GEEST, J. J. V. D.; COTTA, M. G.; RIBEIRO, D. G. R. Alumínio nos ápices radiculares de espécies nativas do Cerrado. EMBRAPA Cerrados, 2007.
- ANOOP, V. M.; BASU, U.; MCCAMMON, M. T.; MCALISTER-HENN, L.; TAYLOR, G. J. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* 132: 2205-2217, 2003.
- ARAÚJO, G. M. Comparação do estado nutricional de dois cerradões em solo distrófico e mesotróficos no Planalto Central do Brasil. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1984.
- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutr* 3: 643-654, 1981.
- BARONE, P.; ROSELLINI, D.; LAFAYETTE, P.; BOUTON, J.; VERONESI, F.; PARROTT, W. Bacterial citrate synthase expression and soil aluminum tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell Rep* 27: 893-901, 2008.
- BIAMONTI, G.; CACERES, J. F. Cellular stress and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 34 146–153, 2009.
- BOSE, J.; BABOURINA, O.; RENGEL, Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, No. 7, pp. 2251–2264, 2011.
- BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. *Front Plant Sci.* v.4, n.172, 2013.
- CALDWELL, C. R. Analysis of aluminum and divalent cation binding to wheat root plasma membrane proteins using terbium phosphorescence. *Plant Physiol*; 91:233-41, 1989.
- CARVER, B. F.; OWNBY, J. D. Acid Soil Tolerance in Wheat. *Advances in Agronomy* 54:117-173, 1995.
- CHELIUS, D.; BONDARENKO, P. V. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2002,

1, 317–323.

CHEN, H.; LU, C.; JIANG, H.; PENG, J. Global Transcriptome Analysis Reveals Distinct Aluminum-Tolerance Pathways in the Al-Accumulating Species *Hydrangea macrophylla* and Marker Identification. PLoS ONE. v. 10, n.12, 2015.

CHENERY, E. M. Are *Hydrangea* flowers unique? Nature, 158: 240-241, 1946.

CHENERY, E. M. Aluminium in the plant world. Part I, General survey in dicotyledons. Kew bulletin, v.2, p.173-183, 1948.

CHO, E. J.; YUEN, C. Y.; KANG, B. H.; ONDZIGHI, C. A.; STAEHELIN, L. A.; CHRISTOPHER, D. A. Protein disulfide isomerase-2 of *Arabidopsis* mediates protein folding and localizes to both the secretory pathway and nucleus, where it interacts with maternal effect embryo arrest factor. Mol. Cells, 32,459-75, 2011.

ČIAMPOROVÁ, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminum at organ, tissue, and cellular levels. Biol. Plant. 45, 161–71, 2002.

COSGROVE, D. J. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. Planta, 177:121-30, 1989.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. Nature Reviews Molecular Cell Biology 6, 850-861, 2005.

CUENCA, G.; HERRERA, R.; MERIDA, T. Distribution of aluminum in accumulator plants by X-ray microanalysis in *Richeria grandis* Vahl leaves from a cloud forest in Venezuela. Plant Cell Environ. 14: 437–441, 1991.

DAI, H.; CAO, F.; CHEN, X.; ZHANG, M.; AHMED, I.M.; CHEN, Z.H.; LI, C.; ZHANG, G.; WU, F. Comparative proteomic analysis of aluminum tolerance in Tibetan wild and cultivated barleys. PLoS ONE, 8, e63428, 2013.

DECREUX, A.; MESSIAEN, J. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium induced conformation. Plant Cell Physiol. 46: 268-278, 2005.

De La FUENTE, J. M.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. Science 276: 1566-1568, 1997.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C. D.; BENNET, R. J.; JAGADISH, V. C.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. Plant Physiol 103: 685–693, 1993.

DELHAIZE, E. *et al.* Transcriptional regulation of aluminum tolerance genes. Trends in Plant Science, v. 17, n. 6, p. 341-348, 2012.

DURESSA, D.; SOLIMAN, K.; TAYLOR, R.; SENWO, Z. Proteomic analysis of soybean roots under aluminum stress. J. Plant Genom, 282531, 2011.

- EXLEY, C. A molecular mechanism of aluminium-induced Alzheimer's disease? *J. Inorg. Biochem.* 76: 133-140, 1999.
- EXLEY, C. Avoidance of aluminium by rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 933-939, 2000.
- EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; KAWAMURA, M.; MATSUMOTO, H. Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 918–927, 2001.
- EZAKI, B.; HIGASHI, A.; NANBA, N.; NISHIUCHI, T. An S-adenosyl Methionine Synthetase (SAMS) Gene from *Andropogon virginicus* L. Confers Aluminum Stress Tolerance and Facilitates Epigenetic Gene Regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 7:1627, 2016.
- FITCH, W. M. Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst. Zool.* 19, 99, 1970.
- FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Rev. Pl. Physiol.* 29:511-566, 1978.
- FOY, C. D. Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. In: ADAMS, F. ed. *Soil acidity and liming*. Madison, American Society of Agronomy, 2.ed. p.57-97, 1984.
- FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:41-71, 2005.
- FURLEY, P. A.; RATTER, J. A. Soil resources and plant communities of the central brazilian Cerrado and their development. *Journal of Biogeography* 15: 97-108, 1988.
- GODBOLD, D. L.; FRITZ, E.; HIITTERMAN, A. Aluminum toxicity and forest decline. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3888-3892, 1988.
- GOEPFERT, S.; POIRIER, Y. Beta-oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Curr Opin Plant Biol.* Jun;10(3): 245-51, 2007.
- GOODLAND, R. Oligotrofismo e Al no Cerrado. In FERRI, M.G (ed), III Simpósio sobre o Cerrado. p. 44- 60. EDUSP, São Paulo, 1971.
- GOODWIN, S.; SUTTER, T. Microarray analysis of *Arabidopsis* genome response to aluminum stress. *Biol Plant*, 53: 85-99, 2009.
- HAMEL, F.; BRETON, C.; HOUDE, M. Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. *Planta*, 205: 531, 1998.
- HARIDASAN, M. Aluminum accumulation by some Cerrado native species of central Brazil. *Plant and Soil.* v. 65, p.265-273, 1982.

- HARIDASAN, M.; ARAÚJO, G. M. Aluminum accumulating species in two forest communities in the Cerrado region of central Brazil. *Journal Forest Ecology and Management* v. 24, p.15-26, 1987.
- HARIDASAN, M.; ARAÚJO, G. M. Aluminum-accumulating species in two forest communities in the Cerrado region of central Brazil. *Journal Forest Ecology and Management*, v. 24, p. 15-26, 1988.
- HARIDASAN, M.; ARAÚJO, G. M. Perfil nutricional de espécies lenhosas de duas florestas semidecíduas em Uberlândia, MG. *Revista brasileira de Botânica*. v. 28, p. 295-303, 2005.
- HARIDASAN, M. Competição por nutrientes em espécies arbóreas do Cerrado. In: Scariot A, Felfili J M, Sousa-Silva J C (eds), *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. pp. 167-178. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2005.
- HARIDASAN, M. Nutrição mineral das plantas nativas do Cerrado, 2005.
- HARIDASAN, M. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? In: Prado, CHBA; Casali, CA. *Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral*. Barueri, Editora Manole. v. 85, n.204, p.1553-1559, 2008.
- HARIDASAN, M.; MORENO, M. I. C.; SCHIAVINI, I. Fatores edáficos influenciando na estrutura de fitofisionomias do cerrado. *Caminhos da Geografia, Uberlândia*, v. 9, n.25, p. 173-194, 2008.
- HE, Z. H.; CHEESEMAN, I.; HE, D.; KOHORN, B. D. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, WAK1–5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 39: 1189–1196, 1999.
- HOEKENGA, A. O, *et al.* AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *PNAS* 103: 9738-9743, 2006.
- HUTCHINSON, G. E. The biogeochemistry of aluminum and of certain related elements. *Quart. Rev. Biol.* 18: 1-29, 1943.
- HUTCHINSON, G. E.; WOLLACK, A. Biological accumulators of aluminum. *Trans. Conn. Acad. Arts & Sci.* 35: 73-128, 1943.
- HUTCHINSON, G. E. Aluminum in soils, plants, and animals. *Soil Sci.* 60: 29-40, 1945.
- IUCHI, S.; KOYAMA, H.; IUCHI, A.; KOBAYASHI, Y.; KITABAYASHI, S. *et al.* Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *PNAS*, 104:9900-5, 2007.
- IUCHI, S. *et al.* The cyclophilin a diageotropica gene affects auxin transport in both root and shoot to control lateral root formation. *Development*, 142, 712-21, 2015.

- JANSEN, S.; BROADLEY, M.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Botanical Review*, v. 68, p. 235-269, 2002.
- JIANG, H. X.; YANG, L. T.; QI, Y. P.; LU, Y. B.; HUANG, Z. R.; CHEN, L. S. Root iTRAQ protein profile analysis of two citrus species differing in aluminum tolerance in response to long-term aluminum toxicity. *BMC Genom*, 16, 949, 2015.
- JORRIN, J. V.; RUBIALES, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G. *et al.*, Proteomics: a promising approach to study biotic interaction in legumes. A review. *Euphytica*, 147, 37-47, 2006.
- JORRIN, J. V. *et al.* Fourteen years of plant proteomics reflected in *Proteomics*: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. Review. *Proteomics*, 15, 1089–1112, 2015.
- JUNG, J. K.; MCCOUCH, S. Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. *Front. Plant Sci.* 4, 186, 2013.
- KANEHISA, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 428, 726-731, 2016.
- KINRAIDE, T. B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil* 134: 167–178, 1991.
- KINRAIDE, T. B. Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. *J. Exp.Bot.* 48, 1115–1124, 1997.
- KLUG, B.; HORST, W. J. Spatial characteristics of aluminium uptake and translocation in roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) *Physiologia Plantarum*, 2010.
- KOCHIAN, L. V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review Plant Physiology. Journal Plant Molecular Biology*, Nova Iorque, v.48, p.237-260, 1995.
- KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Journal Plant Biol.*v. 55. p.459–493, 2004.
- KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274:175–195, 2005.
- KOCHIAN, L.; PIÑEROS, M.; LIU, J.; MAGALHAES, J. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66:23.1-23.28, 2015.

KOYAMA, H.; KAWAMURA, A.; KIHARA, T.; HARA, T.; TAKITA, E.; SHIBATA D. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol* 41: 1030-1037, 2000.

KUMARI, M.; TAYLOR, G. J.; DEYHOLOS, M. K. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics*. 279, 339–357, 2008.

LARSEN, P. B.; TAI, C. Y.; KOCHIAN, L. V.; HOWELL, S. H. *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol*. 110: 743–751, 1996.

LI, H. *et al.* Aluminum Toxicity-Induced Alterations of Leaf Proteome in Two Citrus Species Differing in Aluminum Tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1180, 2016.

LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R., 3rd. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.*, 76, 4193–4201, 2004.

LOPES, A. S.; COX, F. R. Cerrado vegetation in Brazil: an edaphic gradient. *Agronomy Journal* 69: 828-831, 1977.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 352p. 1992.

LOU, H. Q. *et al.* Rice Bean *VuFDH* Functions as a Formate Dehydrogenase That Confers Tolerance to Aluminum and low pH (H<sup>+</sup>)<sup>1</sup>. *Plant Physiology Preview*. DOI:10.1104/pp.16.01105, 2016.

MA, J. F.; HIRADATE, S.; NOMOTO, K.; IWASHITA, T.; MATSUMOTO, H. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea. Identification of Al form in the leaves. *Plant Physiol*. 113:1033–1039, 1997.

MA, J. F. Role of Organic Acids in Detoxification of Aluminum in Higher Plants. *Plant Cell Physiol*. 41(4): 383-390, 2000.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. “Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids”. *Trends in Plant Science*, v.6, p.273-278, 2001.

MA, J. F.; FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, New York, v.97, n.1, p.46-51, 2003.

MA, B.; JOHNSON, R. *De Novo* Sequencing and Homology Searching. *Molecular & Cellular Proteomics* 11: 10.1074/mcp.O111.014902, 1–16, 2012.

MANGEON, A. *et al.* *AtGRP3* Is Implicated in Root Size and Aluminum Response Pathways in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 11 (3), 2016.

MAO, C. Z.; YI, K. K.; YANG, L.; ZHENG, B. S.; WU, Y. R.; LIU, F. Y. *et al.* Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.):

aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *J Exp Bot*, 55:137-43, 2004.

MARHAVY, P.; VANSTRAELEN, M.; DE RYBEL, B.; ZHAOJUN, D.; BENNETT, M. J.; BEECKMAN, T.; BENKOVA, E. Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *EMBO J.*, 32, 149–158, 2013.

MARTIN, R. B. *In* Metal Ions in Biological Systems: Aluminum and its Role in Biology, Vol. 24. Edited by Sigel, H. and Sigel, A. pp. 1-57. Marcel Dekker, New York, 1988.

MELO, J. R. Perfil metabólico e aspectos ultraestruturais de plantas de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) crescidas na presença e ausência de alumínio. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, 2016.

MILLA, M. A. R.; BUTLER, E.; HUETE, A. R.; WILSON, C. F.; ANDERSON, O.; GUSTAFSON, J. P. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. *Plant Physiol.* 130:1706-16, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Journal Physiologia Plantarum*, Copenhagen. v.15, p.473-497, 1962.

NEILSON, K. A.; ALI, N. A.; MURALIDHARAN, S.; MIRZAEI, M.; MARIANI, M.; ASSADOURIAN, G.; LEE, A.; VAN SLUYTER, S. C.; HAYNES, P. A. Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*, 11 (4), 535-553, 2011.

OH, M. W.; ROY, S. K.; KAMAL, A. H.; CHO, K.; CHO, S. W.; PARK, C. S.; CHOI, J. S.; KOMATSU, S.; WOO, S. H. Proteome analysis of roots of wheat seedlings under aluminum stress. *Mol. Biol. Rep.*, 41, 671–681, 2014.

ONG, S. E.; FOSTER, L. J.; MANN, M. Mass spectrometric based approaches in quantitative proteomics. *Methods*, 29, 124–130, 2003.

ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.*, 1, 252–262, 2005.

PODWOJSKI, K.; EISENACHER, M.; KOHL, M.; TUREWICZ, M. *et al.*, Peek a peak: a glance at statistics for quantitative label-free proteomics. *Expert. Rev. Proteomics*, 7, 249–261, 2010.

POIRIER, Y.; ANTONENKOV, V. D.; GLUMOFF, T.; HILTUNEN, J. K. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1413–1426, 2006.

RAO, I. M.; ZEIGLER, R. S.; VERA, R.; SARKARUNG, S. Selection and Breeding for Acid-Soil Tolerance in Crops. *BioScience*, Vol. 43, No. 7, International Agricultural Research, pp. 454-465, 1993.

- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, v.80, p.223-230, 1997.
- REMMERIE *et al.* Next generation functional proteomics in non-model plants: A survey on techniques and applications for the analysis of protein complexes and post-translational modifications. *Phytochemistry*, 72, 1192–1218, 2011.
- RICHARDS, K. D.; SCHOTT, E. J.; SHARMA, Y. K.; DAVIS, K. R.; GARDNER, R. C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116: 409–418, 1998.
- ROBINSON, W. O.; EDGINGTON, G. Minor elements in plants, and some accumulator plants. *Soil Sci.* 60: 15-28, 1945.
- RODRIGUES, R. F.; MONTEIRO DE ARAUJO, G. Vegetation structure and soil characteristics of a dystrophic and a mesotrophic cerradão in the Triângulo Mineiro. *Bioscience Journal*. v. 29, p.2013 -2029, 2013.
- ROEPSTORFF, P. Mass spectrometry based proteomics, background, status and future needs. Mini-review. *Protein Cell*, 3(9): 641–647, 2012.
- ROY, A. K.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Some aspects of aluminum toxicity in plants. *Bot. Rev. (Lancaster)* 54: 145-178, 1988.
- RYAN, P. R.; SHAFF, J. E.; KOCHIAN, L. V. Aluminum toxicity in roots: Correlation among ionic currents, Ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. *Plant Physiol.*, 99, 1193–200, 1992.
- RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; JONES, D. L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v. 52, p. 527–560, 2001.
- RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W. H.; DELHAIZE, E. Identification of aluminium-resistance genes in plants provides an opportunity for enhancing the acid-soil tolerance of crop species. *J. Exp. Bot.* 62:9–20, 2011.
- SADE, H.; MERIGA, B.; SURAPU, V.; GADI, J.; SUNITA, M. S.; SURAVAJHALA, P.; KAVI KISHOR, P. B. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. *BioMetals*. v. 29, p. 187-210, 2016.
- SAWAKI, Y.; IUCHI, S.; KOBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; IKKA, T.; SAKURAI, N.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; SHIBATA, D.; KOBAYASHI, M.; KOYAMA, H. *STOP1* regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiology* 150: 281-294, 2009.
- SCHMID, K. M.; OHLROGGE, J. B. Lipid metabolism in plants. D.E. Vance and J.E. Vance (Eds.) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and membranes* (4th Ed.), 2002.
- SHINOZAKI, K.; KOBAYASHII, M. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton

tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. PNAS 104: 9900–9905, 2007.

SILVA JÚNIOR, M. C.; SANTOS, G. C.; NOGUEIRA, P. E.; MUNHOZ, C. B. R.; RAMOS, A. E. 100 Árvores do Cerrado. Guia de campo. Brasília: Rede de sementes do Cerrado. 278 p., 2005.

SILVA, R. C. Avaliação Fisiológica-Molecular de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) em Resposta ao Alumínio. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, 2012.

SMITH, L. M.; KELLEHER, N. L. Proteoform: a single term describing protein complexity. Nat. Methods, 10, 186–187, 2013.

STEEN, H.; PANDEY, A. Proteomics goes quantitative: measuring protein abundance. Trends Biotechnol, 20, 361–364, 2002.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J. *et al.* STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life, Nucleic Acids Res. 43 D447–D452, 2015.

TABUCHI, A.; MATSUMOTO, H. Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. Physiologia Plantarum, Vol. 112, Issue 3 July, 353–358, 2001.

TAKEDA, K.; KARIUDA M.; ITOI, H. Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. Phytochemistry 24: 2251-2254, 1985.

TAYLOR, G. J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. In: Randall DD, Blevins DG, Miles CD, eds. Ultraviolet-B radiation stress, Aluminum stress, Toxicity and Tolerance, Boron Requirements, Stress and toxicity, Volume 10, Current topics in Plant Biochemistry and Physiology. Interdisciplinary plant biochemistry and physiology program, University of Missouri-Columbia, 57-93, 1991.

TESFAYE, M.; TEMPLE, S. J.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P.; SAMAC, D. A. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. Plant Physiol 127: 1836-1844, 2001.

TSUTSUI, T.; YAMAJI, N.; HUANG, C. F.; MOTOYAMA, R.; NAGAMURA, Y.; MA, J. F. Comparative genome-wide transcriptional analysis of Al-responsive genes reveals novel Al tolerance mechanisms in rice. PloS One. 7, e48197, 2012.

VON UEXKULL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. Plant and Soil 171:1-15, 1995.

WANG, Q. F.; ZHAO, Y.; YI, Q.; LI, K. Z.; YU, Y. X.; CHEN, L. M. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic tobacco leaves: enhanced malate synthesis and augmented Al-resistance. Acta Physiol Plant 32: 1209-1220, 2010.

- WANG, C. Y.; SHEN, R. F.; WANG, C.; WANG, W. Root protein profile changes induced by Al exposure in two rice cultivars differing in Al tolerance J. Proteomics 78, 281 - 293, 2013.
- WANG, Z. Q.; XU, X. Y.; GONG, Q. Q.; XIE, C.; FAN, W.; YANG, J. L.; LIN, Q. S.; ZHENG, S. J. Root proteome of rice studied by iTRAQ provides integrated insight into aluminum stress tolerance mechanisms in plants. J. Proteom. 98, 189–205, 2014.
- WANG, X. *et al.* Gel-free/label-free proteomic analysis of root tip of soybean over time under flooding and drought stresses. J Prot., 2015.
- WANG, L. *et al.* Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. Planta, 2015.
- WILKINS, M. R.; SANCHES, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K. L.; Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by Genome Should be Identified and How to do it. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 13, p. 19-50, 1995.
- YAMAJI, N.; HUANG, C. F.; NAGAO, S.; YANO, M.; SATO, Y.; NAGAMURA, Y.; *et al.* A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. Plant Cell, 21:3339-49, 2009.
- YANG, Q. S.; WANG, Y. Q.; ZHANG, J. J.; SHI, W. P.; QIAN, C. M.; PENG, X. X. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. Proteomics, 7:737-49, 2007.
- YANG, L.; TIAN, D.; TODD, C. D.; LUO, Y.; HU, X. Comparative proteome analyses reveal that nitric oxide is an important signal molecule in the response of rice to aluminum toxicity. J. Proteome Res. 12, 1316–1330, 2013.
- YANG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; SHI, W.; QIAN, C.; PENG, X. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: Cysteine synthase as a key player in Al response. Proteomics, 7, 737–749, 2013.
- YANG, Z; CHEN, J.; DOU, R.; GAO, X.; MAO, C.; WANG, L. Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). International Journal Environmental Research and Public Health. v. 12, n.12, p.15100-15109, 2015.
- YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J. F. Global transcriptome analysis of Al-induced genes in an Al-accumulating species, common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Plant Cell Physiology. v. 55, n. 12, p. 2077-2091, 2014.
- YU, L.; JIANG, J.; ZHANG, C.; JIANG, L.; YE, N.; LU, Y.; YANG, G.; LIU, E.; PENG, C.; HE, Z.; PENG, X. Glyoxylate rather than ascorbate is an efficient precursor for oxalate biosynthesis in rice. J. Exp. Bot. 61:1625-34, 2010.
- YU, Y.; JIN, C.; SUN, C.; WANG, J.; YE, Y.; ZHOU, W.; LU, L.; LIN, X. Inhibition of ethylene production by putrescine alleviates aluminium-induced root inhibition in

wheat plants. *Scientific Reports*. v.6, p. 18888, 2016.

ZHANG, J. J.; HE, Z. H.; TIAN, H.; ZHU, G. H.; PENG, X. X. Identification of aluminium-responsive genes in rice cultivars with different aluminium sensitivities. *J Exp Bot.*, 58:2269-78, 2007.

ZHAO, C. R.; IKKA, T.; SAWAKI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, Y.; HIBINO, T.; SATO, S.; SAKURAI, N.; SHIBATA, D.; KOYAMA, H. Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 9: 32, 2009.

ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiology*. 117:745–751, 1998.

ZHEN, Y.; QI, J. L.; WANG, S. S.; SU, J.; XU, G. H.; ZHANG, M. S.; MIAO, L.; PENG, X. X.; TIAN, D.; YANG, Y. H. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiol. Plant.*, 131, 542–554, 2007.

ZHOU, S.; SAUVÉ, R.; THANNHAUSER, T.W. Proteome changes induced by aluminum stress in tomato roots. *J. Exp. Bot.*, 60, 1849–1857, 2009.

ZHOU, S. *et al.* Proteome Modification in Tomato Plants upon Long-term Aluminum Treatment, *J. Proteome Res.*, 2016.

ZHOU, D.; YANG, Y.; ZHANG, J.; JIANG, F.; CRAFT, E.; THANNHAUSER, T. W.; KOCHIAN, L. V.; LIU, J. Quantitative iTRAQ Proteomics Revealed Possible Roles for Antioxidant Proteins in Sorghum Aluminum Tolerance. *Rev. Plant Sci.* v. 7, n.2043, 2017

## 11. ANEXOS

**Anexo 1.** Proteínas diferencialmente abundantes identificadas em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao Al com *fold change*  $\geq 1,5$  a partir de análises LC-MS/MS.

Identificação <sup>a</sup>	Descrição proteína <sup>b</sup>	Nº peptídeos <sup>c</sup>	Score <sup>d</sup>	Anova (p) <sup>e</sup>	Fold change <sup>f</sup>
<b>Proteínas reguladas negativamente</b>					
TR28340 c1_g4_i2 m.93750	heat shock 90- chloroplastic	2	97,75	0,000257	1,563805
TR23150 c3_g1_i1 m.37088	endochitinase EP3-like	1	55,95	2,44E-05	489,8545
TR18422 c0_g1_i2 m.13054	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	4	362,97	0,000924	1,902763
TR25558 c3_g1_i1 m.60185	enolase	6	414,31	0,000169	2,265192
TR21697 c0_g3_i2 m.27213	aspartyl protease family At5g10770	3	198,1	0,000597	2,485804
TR27907 c1_g1_i3 m.87788	annexin D4	3	184,29	0,000373	4,234899
TR33163 c2_g1_i2 m.172218	biotin carboxyl carrier of acetyl-chloroplastic isoform X1	1	27,12	0,000299	3,714842
TR29308 c1_g1_i1 m.107502	chloroplastic	2	83,24	0,001176	2,242572
TR21806 c0_g1_i3 m.27835	monodehydroascorbate reductase	1	54,45	0,003101	1,772758
TR22831 c1_g1_i2 m.34707	heat shock cognate 70 kDa 2	1	30,27	0,002222	2,266049
TR26552 c0_g1_i7 m.70678	germin subfamily 1 member 13	1	32,39	0,000699	23,48057
TR26560 c0_g4_i5 m.70795	GTP-binding nuclear Ran-3	1	66,67	0,001274	3,135735
TR30643 c1_g1_i2 m.127685	sucrose synthase 2	1	59,08	0,006041	1,406972
TR31367 c0_g7_i7 m.139833	phosphomannomutase phosphoglucomutase isoform X2	1	60,49	0,002692	1,664264
TR34094 c1_g10_i1 m.190295	DPP6 N-terminal domain	6	337,68	0,002091	2,826051
TR31376 c1_g5_i8 m.139969	glutathione S-transferase zeta class-like isoform X2	1	46,38	0,002314	2,184135
TR30244 c1_g1_i1 m.121317	heat shock cognate 70 kDa 2	1	55,83	0,00247	1,895222
TR30771 c0_g2_i2 m.129410	pyruvate cytosolic isozyme	1	59,6	0,001575	5,321753
TR34196 c2_g2_i17 m.192522	glyceraldehyde-3-phosphate cytosolic	3	141,58	0,001511	3,867713
TR24525 c0_g2_i4 m.49177	FAM10 family At4g22670	2	92,13	0,001843	6,193862
TR23009 c0_g1_i1 m.35959	uncharacterized oxidoreductase At4g09670	3	209,39	0,003934	2,502054
TR27423 c0_g1_i1 m.81871	alpha-glucosidase	1	43,83	0,006061	2,300499
TR26796 c0_g2_i1 m.73843	mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha	1	63,7	0,005956	2,16953
TR29889 c1_g2_i4 m.115824	betaine aldehyde dehydrogenase chloroplastic	1	44,94	0,008973	1,605088
TR33747 c1_g4_i1 m.183725	aconitate cytoplasmic	4	228,5	0,006547	2,262226
TR29808 c0_g1_i1 m.114503	disulfide-isomerase	2	118,86	0,00559	2,93377
TR19360 c0_g1_i1 m.15799	trithorax group osa	1	87,16	0,004529	4,572026
TR22010 c2_g2_i9 m.29353	lactoylglutathione lyase	6	587,75	0,004692	4,423511
TR24388 c0_g1_i2 m.48012	hsp70-Hsp90 organizing 3-like	5	225,52	0,006246	2,468338

TR28664 c2_g2_i2 m.98113	Lysosomal alpha-mannosidase	2	111	0,005547	3,456586
TR28820 c1_g1_i1 m.100544	alpha-xylosidase 1	5	239,3	0,006021	3,331878
TR28909 c0_g2_i7 m.101755	phosphoglycerate cytosolic	6	362,4 5	0,005902	3,072986
TR29154 c0_g3_i5 m.105405	ru large subunit-binding subunit alpha	5	206,8 8	0,005701	3,397416
TR30199 c0_g2_i1 m.120604	elongation factor 1-gamma-like	2	135,2 2	0,018323	1,72134
TR31561 c0_g1_i1 m.143259	selenium-binding 1-like	1	54,73	0,013269	1,794014
TR31726 c0_g1_i9 m.146183	Beta-D-xylosidase 1	2	122,7 8	0,042862	1,312997
TR33382 c0_g1_i4 m.176549	cytosolic phosphoglucose partial	1	45,13	0,004423	3,510893
TR17811 c0_g1_i3 m.11531	10 kDa chaperonin-like	2	52,94	0,003228	36,64995
TR27864 c3_g2_i2 m.87254	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104436704	1	27,19	0,013506	2,05598
TR19541 c0_g1_i4 m.16411	NAD-dependent malic enzyme 59 kDa mitochondrial	3	148,8 4	0,009415	2,841714
TR21541 c0_g1_i4 m.26124	glutathione chloroplastic	1	56,86	0,006852	3,308645
TR26343 c2_g3_i1 m.68303	aldose 1-epimerase	1	33,75	0,005716	7,549616
TR27948 c3_g2_i2 m.88397	actin-7	1	32,6	0,005751	3,829406
TR30080 c6_g1_i3 m.118859	kDa class I heat shock	2	158,5 4	0,005242	8,342684
TR32442 c0_g2_i1 m.158663	kDa class I heat shock -like	1	54,33	0,004789	6,791622
TR33154 c5_g1_i8 m.172010	villin-3 isoform X1	2	67,5	0,014705	2,145651
TR24371 c0_g1_i1 m.47841	heat shock 83	1	39,86	0,004927	23,33533
TR30222 c1_g2_i1 m.120960	heat shock cognate 80	8	585,3 3	0,014049	2,15448
TR20947 c0_g1_i1 m.22977	enolase chloroplastic	1	60,84	0,004503	43,15313
TR21610 c0_g7_i1 m.26549	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-1	1	74,16	0,016455	2,288459
TR25007 c1_g1_i1 m.53965	kDa class I heat shock	4	367,1 1	0,007418	6,836371
TR29864 c3_g1_i5 m.115490	dihydrolipoyl dehydrogenase mitochondrial	1	82,95	0,007804	4,842956
TR30054 c0_g1_i3 m.118569	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase chloroplastic-like	5	340,4	0,011953	2,698182
TR30309 c1_g2_i1 m.122564	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex mitochondrial-like	2	111,3 1	0,005417	31,47409
TR33094 c0_g3_i6 m.170864	elongation factor 1-alpha	4	197,8 9	0,019706	1,999141
TR33979 c3_g1_i1 m.188075	hypersensitive-induced response 2	1	62,64	0,008837	4,8692
TR25936 c0_g1_i3 m.63971	40S ribosomal S17-4-like	1	75,17	0,011912	2,443053
TR22105 c1_g5_i5 m.29950	glutathione S-transferase F9	1	46,36	0,007059	9,984957
TR24965 c1_g2_i1 m.53615	heat shock 70 kDa	7	447,1 6	0,015863	2,550252
TR26218 c0_g7_i2 m.66865	pathogenesis-related PR-4	1	135,2 1	0,010363	3,207594
TR23401 c1_g1_i3 m.39092	superoxide dismutase [Cu-Zn]	2	351,2 1	0,007086	20,05788
TR30054 c0_g1_i2 m.118568	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase chloroplastic-like	1	51,34	0,027219	1,943293
TR31080 c0_g2_i3 m.134707	kDa class II heat shock	3	171,4 3	0,009711	6,396235
TR21874 c0_g1_i2 m.28278	T-complex 1 subunit epsilon	1	61,52	0,015183	2,355053
TR23469 c1_g1_i1 m.39619	60S ribosomal L28-2	2	128,5	0,009674	11,86247

TR25380 c0_g1_i1 m.58196	glutathione S-transferase DHAR2	1	40,91	0,006544	181,0676
TR25744 c0_g2_i2 m.61917	endo-1,3 1,4-beta-D-glucanase	1	33,82	0,007078	17,98666
TR26966 c1_g3_i2 m.76157	40S ribosomal S14	1	103,8 5	0,009623	6,478429
TR28607 c2_g1_i1 m.97315	fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	3	92,73	0,0086	11,5038
TR28633 c1_g2_i2 m.97700	ADP,ATP carrier mitochondrial	4	151,7 1	0,020326	2,153888
TR31350 c0_g4_i4 m.139494	beta-glucosidase 12-like	2	207,2 4	0,012111	3,66536
TR32374 c0_g2_i1 m.157461	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of pyruvate dehydrogenase mitochondrial-like	1	52,38	0,007277	85,78639
TR28234 c0_g1_i1 m.92435	thyroid receptor-interacting 11	1	22,1	0,015616	3,370899
TR33379 c1_g2_i7 m.176503	enolase	3	318,2 5	0,014104	3,335831
TR14306 c0_g1_i2 m.6669	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 homolog	1	37,65	0,03066	1,810413
TR16195 c0_g1_i5 m.8929	14-3-3 A	2	144,3 3	0,013679	4,437731
TR23545 c0_g1_i1 m.40406	tubulin alpha-3 chain	1	44,51	0,013339	5,039595
TR28010 c0_g2_i5 m.89206	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha 2	1	77,81	0,007046	1713,675
TR29672 c0_g3_i2 m.112649	probable mitochondrial- processing peptidase subunit beta	1	39,09	0,02748	1,988193
TR16224 c0_g1_i2 m.8952	peroxiredoxin- mitochondrial	1	41,22	0,036758	1,915049
TR33388 c0_g2_i5 m.176642	ATP synthase subunit mitochondrial	2	154,8 3	0,012064	7,209244
TR23209 c0_g1_i2 m.37507	probable serine protease EDA2	1	61,32	0,037228	1,856432
TR28869 c0_g1_i8 m.101190	GDP-mannose 3,5-epimerase 2	1	68,04	0,019611	3,273762
TR28998 c1_g2_i1 m.103068	GDSL esterase lipase 1	1	38,07	0,018356	2,743074
TR14311 c0_g3_i3 m.6686	class I chitinase	2	92,55	0,026627	2,456869
TR23098 c1_g1_i3 m.36702	MLP 328	10	691,9 8	0,022052	3,748581
TR25710 c0_g1_i1 m.61631	chaperone 1	5	287,6 7	0,01858	4,452747
TR28174 c0_g4_i1 m.91602	phospholipase A1-IIgamma	9	617,9	0,01493	8,776874
TR29569 c0_g2_i1 m.111249	lysosomal beta glucosidase-like	1	62,85	0,044514	1,839185
TR22258 c0_g2_i6 m.31057	TIC 22- chloroplastic	1	60,09	0,022229	3,46087
TR17796 c0_g1_i1 m.11506	MLP 328	1	19,59	0,019209	4,981971
TR24169 c0_g1_i8 m.45902	superoxide dismutase [Cu-Zn]	1	215,2 9	0,01189	60,61985
TR33295 c0_g5_i1 m.174885	E3 ubiquitin- ligase RNF25	1	64,55	0,012508	20,90731
TR32665 c0_g2_i1 m.162704	kinesin-like calmodulin-binding isoform X1	1	22,03	0,012981	26,07403
TR33747 c1_g5_i1 m.183729	aconitate cytoplasmic	2	102,7 1	0,021146	4,918851
TR19023 c0_g1_i2 m.14860	small heat shock chloroplastic	2	96,02	0,017145	12,29534
TR26010 c0_g1_i2 m.64733	diaminopimelate decarboxylase chloroplastic-like	1	63,11	0,028871	2,731275
TR33958 c3_g2_i1 m.187652	CBS domain-containing mitochondrial-like	1	66,51	0,040605	2,030666
TR29248 c0_g1_i1 m.106797	heat shock 70 kDa 8	2	103,6 7	0,021025	4,889814
TR32686 c0_g1_i2 m.163166	elongation factor 2	3	145,9 4	0,018258	8,468281

TR33379 c1_g3_i2 m.176502	enolase	1	37,94	0,031652	2,950543
TR22287 c0_g1_i5 m.31299	probable L-ascorbate peroxidase chloroplastic isoform X1	2	75,47	0,029436	3,320714
TR26552 c0_g1_i3 m.70670	germin subfamily 1 member 13	1	19,75	0,021844	6,354428
TR30476 c1_g1_i5 m.125130	mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-like	2	73,61	0,026484	5,362573
TR32130 c1_g1_i6 m.153264	NADP-dependent malic enzyme	1	65,51	0,029374	5,151568
TR30895 c0_g1_i6 m.131644	dihydroxy-acid chloroplastic-like	4	213,03	0,044088	2,240923
TR26953 c1_g1_i1 m.76037	probable NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like 1	2	87,29	0,02605	6,014304
TR22831 c0_g1_i2 m.34703	heat shock cognate 70 kDa 2-like	1	51,18	0,024858	4,471629
TR22678 c0_g13_i2 m.33738	desiccation-related PCC13-62	6	398,05	0,030649	4,228642
TR24922 c7_g2_i7 m.53221	mitochondrial outer membrane porin of 34 kDa	1	46,51	0,035398	3,169716
TR27948 c3_g4_i1 m.88410	Actin-7	2	76,73	0,045119	2,366796
TR24899 c1_g1_i5 m.52990	eukaryotic initiation factor 4A-14	1	65,41	0,023033	23,63806
TR25661 c1_g2_i2 m.61201	amaranthin-like lectin	1	39,85	0,033746	4,609722
TR34094 c1_g10_i3 m.190297	DPP6 N-terminal domain	1	64,59	0,027144	9,421306
TR16635 c0_g1_i1 m.9465	40S ribosomal S19-3	1	69,61	0,043171	3,155557
TR28450 c2_g1_i6 m.95188	biotin carboxylase chloroplastic	1	75,86	0,02478	22,89037
TR33120 c0_g1_i1 m.171475	scopoletin glucosyltransferase-like	1	54,98	0,041643	3,575063
TR33387 c1_g2_i12 m.176607	acylamino-acid-releasing enzyme isoform X1	1	63,52	0,043127	3,306158
TR27193 c0_g2_i3 m.79146	isoflavone reductase homolog	3	106,54	0,033924	6,596377
TR28296 c0_g3_i7 m.93163	Dynammin-like 120 kDa isoform 1	1	34,51	0,023908	24,65746
TR34293 c4_g1_i8 m.194256	probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 isoform X3	1	68,44	0,047391	3,159087
TR25742 c1_g1_i2 m.61873	nodulin-related 1	1	172,52	0,042225	5,054949
TR34161 c3_g6_i1 m.191625	S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase A	1	40,22	0,044087	4,214433
TR32283 c1_g5_i3 m.155556	calcium permeable stress-gated cation channel 1-like	1	26,91	0,042217	4,658411
TR24861 c0_g1_i2 m.52725	heat shock 22 kDa mitochondrial-like	1	75,49	0,039288	10,17515
TR29193 c1_g1_i1 m.105970	cyanate hydratase	1	43,55	0,040746	13,18065
TR29421 c1_g1_i3 m.109120	aldehyde dehydrogenase family 2 member C4-like	1	43,98	0,016241	30,57913
TR27923 c1_g5_i1 m.87979	quinone oxidoreductase-like	1	46,46	0,028764	49,10528
TR22209 c0_g1_i5 m.30782	probable glutathione peroxidase 8	1	54,27	0,028109	133,148
TR27048 c1_g1_i2 m.77253	universal stress A	1	49,59	0,024551	283,8048
TR28044 c0_g3_i13 m.89665	serine--tRNA ligase	1	78,09	0,035062	22,29457
TR34134 c3_g3_i1 m.191199	probable phosphoribosylformylglycinamide chloroplastic mitochondrial	1	41,19	0,032351	18,45291

### Proteínas reguladas positivamente

TR29286 c0_g5_i3 m.107198	transport SEC13 homolog B	4	335,07	0,000245468	8,568179316
---------------------------	---------------------------	---	--------	-------------	-------------

TR37322 c0_g1_i1 m.196425	calmodulin	2	131,0 4	0,0002558 41	6,7570878 93
TR25679 c0_g1_i6 m.61365	RNA-binding 24 isoform X2	1	70,7	0,0006610 04	20,549560 41
TR17614 c0_g1_i2 m.11125	60S acidic ribosomal P2A-like	1	33,77	0,0006542 24	7,0703521
TR26167 c0_g1_i1 m.66375	pectinesterase-like	2	68,46	0,0008593 4	5,4177424 31
TR26745 c0_g4_i1 m.73245	60S ribosomal L19-1	1	52,9	0,0007810 07	5,5030038 67
TR33049 c0_g1_i1 m.170033	probable NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1- like 1	2	133,2 4	0,0006604 16	3,1553857 75
TR17661 c0_g1_i1 m.11249	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	2	101,7 2	0,0011063 11	3,7446388 42
TR25821 c0_g2_i9 m.62840	40S ribosomal S3a	4	341,5 5	0,0006724 63	2,3171679 16
TR25565 c0_g1_i1 m.60257	3-oxo-Delta(4,5)-steroid 5-beta- reductase-like	2	84,46	0,0026038 61	14,303349 96
TR31597 c2_g2_i7 m.143952	CD2 antigen cytoplasmic tail- binding 2 homolog	1	49,29	0,0003532 97	2,3469464 35
TR14903 c0_g1_i2 m.7345	calmodulin 11	1	23,27	0,0021296 8	6,0497417 35
TR21299 c2_g1_i8 m.24836	laccase-9	4	323,0 8	0,0023122 18	4,0290810 73
TR23134 c0_g1_i2 m.37024	universal stress A	1	187,1 7	0,0012686 64	3,9436618 15
TR32050 c1_g1_i3 m.151997	abscisic stress-ripening 2	1	85,54	0,0031886 12	9,5138083 6
TR26285 c0_g1_i2 m.67626	thioredoxin reductase NTRB- like	5	327,6 4	0,0021495 18	4,2971248 41
TR21156 c0_g1_i3 m.23983	Cysteine ase RD19a	3	253,3 6	0,0016867 32	3,3702062 7
TR25418 c3_g4_i3 m.58608	tubulin beta chain	1	51,59	0,0037676 15	8,3808113 92
TR30181 c0_g1_i6 m.120300	Profilin 3 family	1	90,02	0,0036864 91	7,9183785 46
TR24876 c0_g1_i1 m.52807	cytochrome b5 isoform E	2	83,19	0,0040638 34	6,0112971 59
TR34083 c1_g3_i1 m.190141	laccase-14-like isoform X2	1	141,9 1	0,0058529 09	20,916657 76
TR33156 c3_g15_i1 m.172036	alpha-L-arabinofuranosidase 1- like	1	61,56	0,0015352 8	3,1310138 3
TR33050 c0_g4_i8 m.170054	pectin acetylerase 8 isoform X1	2	220,7	0,0037675 82	5,8462010 3
TR19849 c0_g1_i1 m.17687	Xin actin-binding repeat- containing	2	114,8	0,0021102 04	3,5471674 46
TR27816 c0_g2_i2 m.86542	plastid-lipid-associated chloroplastic-like	1	104,2 2	0,0017472 03	3,0593548 45
TR30056 c0_g1_i1 m.118584	stress-response A B barrel domain-containing UP3	4	244,7 4	0,0029538 9	3,4184156 44
TR25998 c0_g4_i4 m.64649	HSP20-like chaperones superfamily isoform 3	2	115,4 3	0,0024266 36	2,7020679 32
TR22352 c0_g2_i2 m.31607	DSBA oxidoreductase family isoform 1	3	155,1 2	0,0004180 45	2,1534245 25
TR23538 c0_g1_i1 m.40383	peroxidase 12-like	3	201,4 7	0,0025477 14	3,1678424 46
TR20037 c0_g1_i1 m.18482	polyadenylate-binding RBP45C	2	111,7 9	0,0066529 13	10,479645 22
TR32378 c1_g8_i5 m.157490	alcohol dehydrogenase 1	9	553,0 5	0,0028660 94	3,5062817 23
TR27352 c0_g1_i2 m.80877	60S acidic ribosomal P0	3	181,9 4	0,0033736 22	3,3660113 62

TR33902 c1_g1_i1 m.186605	5 -nucleotidase -like isoform X1	2	98,48	0,0042007 75	4,1359076 46
TR19865 c0_g1_i12 m.17769	stress-response A B barrel domain-containing At5g22580	2	162,5 6	0,0072977 62	13,281801 22
TR32434 c1_g1_i1 m.158511	glycine-rich 2-like	1	60,36	0,0050863 75	4,9333835 09
TR30444 c2_g1_i2 m.124699	probable 6-phosphogluconolactonase chloroplastic	3	178,4 7	0,0029698 2	3,1244016 69
TR33142 c3_g1_i4 m.171826	glutathione S-transferase L3-like	3	207,0 4	0,0016690 07	2,3405541 96
TR22648 c0_g1_i2 m.33495	5 -nucleotidase -like	1	59,15	0,0066482 77	6,6321554 36
TR26387 c0_g1_i3 m.68703	receptor kinase FERONIA	3	150,0 3	0,0033448 34	3,1486054 38
TR27216 c0_g2_i6 m.79415	isocitrate dehydrogenase [NADP]	4	281,6 4	0,0009810 48	2,0581841 55
TR26139 c2_g3_i2 m.66156	malate chloroplastic	4	203,8 7	0,0017257 87	2,4321813 92
TR17521 c0_g1_i1 m.10961	fasciclin-like arabinogalactan 8	1	54,61	0,0043896 46	3,6717391 18
TR23992 c1_g1_i3 m.44050	DNA repair RAD23-3	2	149,7 8	0,0065293 19	4,0977232 73
TR24036 c0_g1_i4 m.44587	40S ribosomal S9-2	4	249,5	0,0051770 87	3,3984921 92
TR25526 c0_g2_i8 m.59828	succinate dehydrogenase subunit mitochondrial	2	206,7 2	0,0082764 52	5,0179757 05
TR26361 c1_g2_i2 m.68491	serine carboxypeptidase-like 13	8	680,0 4	0,0054461 79	3,5117928 4
TR32406 c0_g4_i2 m.157928	mannosylglyco endo-beta-mannosidase	1	32,64	0,0060758 25	3,4551549 57
TR26943 c0_g1_i2 m.75928	NHP2 1	2	147,7	0,0059483 8	3,6529190 48
TR31237 c0_g1_i4 m.137626	serine carboxypeptidase-like 18	3	211,8	0,0062589 36	3,9171106 56
TR20043 c0_g2_i1 m.18498	60S acidic ribosomal P2B-like	6	259,3 3	0,0117122 24	14,425312 85
TR29624 c0_g9_i2 m.112019	UDP-glucose pyrophosphorylase	1	86,97	0,0080310 53	3,6670499 55
TR32984 c0_g5_i1 m.168749	glutamyl-tRNA reductase-binding chloroplastic	1	69,31	0,0044292	2,8773519 56
TR20499 c0_g1_i1 m.20543	translationally-controlled tumor homolog	4	312,4 7	0,0091819 64	3,8875613 44
TR23644 c0_g1_i1 m.41140	probable polygalacturonase	7	478,1 6	0,0121262 77	5,7457425 53
TR30074 c1_g1_i3 m.118785	S-adenosylmethionine synthase 2	2	86,4	0,0106255 62	6,6661033 52
TR21740 c0_g2_i2 m.27497	GEM 1	3	197,0 1	0,0095346 32	4,2106731 89
TR24744 c0_g3_i1 m.51435	probable Pop3	1	65,11	0,0161633 54	17,363862 89
TR26898 c1_g2_i3 m.75290	aspartic ase A1	2	136,4 4	0,0051023 14	2,9670675 46
TR21133 c0_g1_i1 m.23907	peroxidase P7-like	4	298,8 2	0,0119900 73	4,5184452 92
TR22890 c0_g1_i2 m.35175	60S ribosomal L35	1	61,66	0,0079076 37	2,8850330 83
TR34135 c0_g1_i1 m.191211	upstream activation factor subunit UAF30-like	1	60,4	0,0172369 94	90,762320 41
TR28547 c0_g4_i20 m.96455	alpha-galactosidase 3	1	72,94	0,0158703 68	6,3787551 37
TR31258 c0_g8_i5 m.137996	60S ribosomal L4	2	134,1 9	0,0150818 12	6,4218603 67

TR31862 c0_g3_i2 m.148498	glycine cleavage system H mitochondrial	2	174,6 1	0,0095043 1	3,7684825 25
TR22107 c1_g2_i2 m.29978	stem-specific TSJT1	1	63,58	0,0057904 81	2,9930867 91
TR2337 c0_g1_i1 m.835	MLP 28	1	56,44	0,0161578 8	9,2691847 79
TR30074 c1_g2_i1 m.118788	S-adenosylmethionine synthase 2	5	326,3 4	0,0111024 97	4,3174070 63
TR29961 c3_g2_i2 m.116916	copper transport ATX1-like	5	635,6 4	0,0109286 63	3,7142941 81
TR20638 c0_g1_i1 m.21331	serine carboxypeptidase-like 18	1	55,27	0,0143821 71	4,6010111 31
TR18343 c0_g1_i1 m.12872	serine carboxypeptidase-like 13	1	165,8 9	0,0101609 32	3,7202510 05
TR26650 c0_g5_i1 m.72207	vacuolar-processing enzyme	1	189,6 2	0,0172365 58	6,2270607 94
TR27739 c3_g1_i2 m.85658	probable polygalacturonase	1	65,4	0,0008474 62	1,7923402 47
TR29555 c1_g3_i4 m.110973	stromal 70 kDa heat shock-related chloroplastic	3	165,6 2	0,0048298 76	2,4601642 62
TR31598 c2_g1_i1 m.143970	dihydropyrimidinase	2	75,57	0,0178411 84	5,7592705 06
TR28770 c2_g2_i10 m.99885	zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing 2 isoform X1	1	63,82	0,0102813 8	3,3741036 03
TR14841 c0_g1_i5 m.7278	40S ribosomal S15-4	1	134,3 6	0,0172943 29	5,0738101 23
TR29203 c1_g1_i2 m.106223	lamin	1	57,88	0,0036668 22	2,3662395 35
TR25868 c1_g1_i3 m.63366	elongation factor 1-beta 1	2	129,4 3	0,0096518 66	2,8829860 62
TR27989 c3_g9_i1 m.88947	polyubiquitin partial	5	281,0 4	0,0109856 78	3,4822335 11
TR24698 c2_g1_i1 m.50962	fasciclin-like arabinogalactan 1	3	209,6 3	0,0115315 76	3,0666577 04
TR25126 c3_g1_i1 m.55225	MLP 31	11	887,1 4	0,0088686 2	2,7555457 69
TR32877 c2_g19_i2 m.166789	tropinone reductase homolog At5g06060-like	1	63,85	0,0232667 97	7,6485669 51
TR23431 c1_g1_i10 m.39317	triosephosphate chloroplastic	3	219,0 7	0,0103449 89	2,7309188 85
TR28941 c0_g2_i1 m.102406	far upstream element-binding 2 isoform X2	1	45,61	0,0317595 68	14,214835 19
TR33765 c0_g4_i10 m.184208	sorbitol dehydrogenase	2	81,4	0,0051657 09	2,3475142 04
TR11900 c0_g1_i1 m.4995	polygalacturonase inhibitor-like	2	161,5 1	0,0145231 65	3,2691547 8
TR24414 c0_g1_i2 m.48206	60S ribosomal L8-3	2	100,2 8	0,0102575 51	2,8108284 32
TR22681 c0_g1_i2 m.33764	40S ribosomal S3	3	232,3 8	0,0063853 75	2,4283987 09
TR31580 c0_g1_i2 m.143645	laccase-9	1	203,4 9	0,0159730 33	3,6058976 88
TR17968 c0_g1_i1 m.11905	uclacyanin-3-like	1	132,6 6	0,0069036 2	2,4649682 4
TR30195 c2_g2_i2 m.120564	cytochrome b5	1	33,77	0,0265035 32	8,1879233 8
TR20172 c0_g1_i1 m.18970	3-hydroxyisobutyryl- hydrolase mitochondrial isoform X1	1	85,73	0,0095579 2	2,9784515 71
TR30872 c0_g2_i9 m.131199	cysteine ase inhibitor-like	3	231,2	0,0259250 71	6,3979710 49
TR32314 c2_g3_i2 m.156323	60S ribosomal L7-2	1	30,79	0,0207090 91	6,0750220 33

TR24607 c0_g1_i6 m.50005	serine carboxypeptidase-like 18	2	160,8	0,0175049 28	3,9503384 32
TR19247 c1_g1_i1 m.15502	serine hydroxymethyltransferase 4	2	155,1 1	0,0008034 98	1,8378989 73
TR19905 c0_g3_i1 m.17950	ankyrin repeat domain-containing 2A	1	86,81	0,0364650 25	14,583445 55
TR28394 c3_g1_i1 m.94373	major allergen Pru ar 1	2	50,79	0,0116641 73	3,0698372 05
TR26129 c1_g2_i2 m.66028	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur mitochondrial	1	63,69	0,0387513 75	51,368917
TR29245 c0_g8_i2 m.106780	universal stress A	2	177,4 5	0,0142528 21	3,1832934 42
TR29624 c0_g10_i1 m.112020	UDP-glucose pyrophosphorylase	2	130,3 8	0,0105528 12	2,9094453 95
TR24722 c1_g2_i1 m.51220	probable fructokinase-4	5	486,0 2	0,0141871 09	3,0964389 23
TR46505 c0_g1_i1 m.198320	Nucleoside diphosphate kinase B	1	75,99	0,0133364 19	3,0071850 05
TR28171 c0_g1_i2 m.91571	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier- ] dehydratase -like	3	149,6 4	0,0132973 42	2,7581352 24
TR32906 c2_g2_i1 m.167258	peroxidase 73	1	43,32	0,0144367 6	2,9433317 81
TR19820 c0_g1_i3 m.17573	60S ribosomal L14-1	1	66,31	0,0229334 15	4,0431441 29
TR17020 c0_g1_i1 m.10039	leucoanthocyanidin reductase	1	37,56	0,0281960 38	7,4272958 52
TR18015 c0_g2_i6 m.11990	60S ribosomal L7-4	4	200,8	0,0291408 89	5,4618643 81
TR23100 c0_g2_i4 m.36747	PREDICTED: uncharacterized protein LOC108955498	1	47,91	0,0274536 09	5,4936956 27
TR25418 c1_g2_i1 m.58579	tubulin beta-1 chain	2	196,3 1	0,0162794 92	3,0969231 08
TR26492 c0_g1_i9 m.69927	xylulose kinase	3	111,6 5	0,0110780 32	2,5957952 12
TR28166 c1_g1_i4 m.91521	PITH domain-containing At3g04780	1	40,19	0,0195996 99	3,3010802 8
TR32717 c1_g1_i2 m.163610	Cyclase family	1	66,35	0,0144632 9	2,7823893 7
TR30693 c0_g2_i5 m.128207	malate dehydrogenase	12	745,8 1	0,0136806 46	2,7460425 99
TR30083 c0_g1_i9 m.118884	Calcium-dependent lipid-binding family isoform 1	2	119,4 3	0,0165515 16	3,4193804 42
TR31926 c1_g2_i10 m.149588	fructose-bisphosphate aldolase class-II	1	52,37	0,0366825 96	7,0405548 31
TR18755 c0_g1_i1 m.14013	fasciclin-like arabinogalactan 7	1	44,41	0,0095108 62	2,4261428 88
TR26629 c0_g2_i3 m.71815	alpha-galactosidase 1	2	97,08	0,0066806 56	2,3475156 71
TR27239 c0_g1_i1 m.79714	histone deacetylase HDT1-like isoform X1	1	66,42	0,0341714 63	5,5318127 74
TR27305 c2_g1_i10 m.80412	low-temperature-induced cysteine ase	4	197,8 2	0,0224868 31	3,9672486 89
TR30709 c1_g1_i10 m.128421	alcohol dehydrogenase 1B	1	66,01	0,0258659 58	4,4674861 74
TR32128 c1_g1_i2 m.153201	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	1	85,32	0,0168729 22	3,0606222 99
TR32625 c0_g2_i2 m.161909	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D-like	1	68,25	0,0240460 13	3,5904575 76
TR49735 c0_g1_i1 m.198940	probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 7	1	68,22	0,0120918 72	2,3987670 41
TR19582 c0_g1_i1 m.16617	monocopper oxidase SKU5	2	143,0 6	0,0295837 17	5,3656263 68

TR27167 c0_g1_i2 m.78911	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	1	58,15	0,0345246 27	5,5692280 44
TR24609 c0_g1_i1 m.50007	subtilisin-like protease	4	253,2 3	0,0170634 38	2,6801066 77
TR22237 c0_g1_i1 m.30896	aspartyl protease family	1	58,94	0,0463718 59	6,8634674 97
TR24416 c0_g1_i3 m.48217	uridine 5'-monophosphate synthase-like	1	55,31	0,0131906 75	2,7890826 55
TR30683 c0_g2_i4 m.128078	endo-1,3 1,4-beta-D-glucanase	3	169,4 2	0,0202030 44	2,9203931 21
TR33720 c0_g2_i6 m.183174	ubiquitin-activating enzyme E1 1	2	102,4 9	0,0170134 13	2,9069197 11
TR30168 c0_g1_i3 m.120080	probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	1	38,09	0,0284185 65	3,7191374 23
TR18071 c0_g2_i1 m.12114	universal stress A	1	63,1	0,0293031 69	4,2763203 97
TR28124 c0_g3_i1 m.90747	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 6	1	87,91	0,0336851 6	4,7612560 52
TR31494 c0_g1_i5 m.142075	polyadenylate-binding RBP45B isoform X3	1	75,7	0,0420540 93	17,307834 11
TR30009 c0_g2_i1 m.117710	peroxidase 31-like	1	75,06	0,0145722 98	37,462905 73
TR28851 c0_g1_i2 m.100999	glucan endo-1,3-beta-glucosidase	1	72,81	0,0406407 34	6,5051948 97
TR33788 c0_g10_i3 m.184545	endo-1,3 1,4-beta-D-glucanase	2	96,52	0,0176565 99	2,8055942 85
TR22779 c0_g1_i3 m.34403	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	1	78,85	0,0419897 82	5,4052012 03
TR31785 c0_g1_i3 m.147174	2-hydroxyacyl- lyase	1	137,3 7	0,0016655 05	1,8686842 09
TR12534 c0_g2_i1 m.5387	40S ribosomal S23	1	59,6	0,0304388 28	3,7400458 49
TR31683 c2_g2_i9 m.145339	glutamate dehydrogenase 2	1	52,59	0,0214338 13	3,1189420 02
TR21868 c0_g1_i4 m.28252	ATP synthase subunit mitochondrial	1	71,88	0,0305840 52	3,7220132 38
TR31631 c0_g2_i2 m.144549	phospholipase D alpha 1	3	185,3 6	0,0032709 09	1,8514290 75
TR7716 c0_g2_i1 m.2835	40S ribosomal S24-1	1	71,95	0,0497612 16	6,8026799 97
TR22143 c0_g1_i3 m.30333	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 homolog	1	34,78	0,0493989 21	10,430596 75
TR29204 c0_g1_i2 m.106232	germin 5-1	1	75,93	0,0486322 99	7,1107653 98
TR26164 c2_g1_i2 m.66356	alpha tubulin 1	4	316,7	0,0128722 49	2,4645462 55
TR30244 c2_g2_i4 m.121334	stromal 70 kDa heat shock-related chloroplastic	1	60,76	0,0483224 97	7,0510062 5
TR26941 c3_g1_i5 m.75902	peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional AIM1	1	47	0,0396176 99	5,0730734 04
TR29001 c0_g6_i2 m.103130	glycine-rich RNA-binding mitochondrial	1	53,88	0,0321826 66	3,3029775 61
TR23194 c1_g1_i4 m.37413	reactive Intermediate Deaminase chloroplastic-like	2	190,4 3	0,0310353 47	4,0159901 77
TR27763 c0_g1_i1 m.85871	titin isoform X2	1	136,4 9	0,0274141 09	3,0910164 18
TR26941 c3_g1_i4 m.75899	peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional AIM1	3	171,3 1	0,0412559 11	4,2282726 13
TR31469 c2_g1_i3 m.141654	probable ATP synthase 24 kDa mitochondrial	1	54,47	0,0326267 94	3,3117929 7
TR27682 c0_g3_i6 m.85082	arginine biosynthesis bifunctional chloroplastic-like	2	95,54	0,0197639 01	2,5074808 92

TR26744 c1_g1_i4 m.73235	transaldolase family	2	131,5 1	0,0148605 7	2,7245545 83
TR26823 c0_g2_i1 m.74116	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur mitochondrial	1	49,57	0,0205133 98	2,5898233 89
TR29245 c0_g8_i1 m.106777	universal stress A	1	37,56	0,0277091 49	3,4158264 02
TR18322 c0_g1_i5 m.12785	phospho-2-dehydro-3- deoxyheptonate aldolase chloroplatic	1	65,99	0,0498066 57	5,0970340 73
TR22531 c1_g3_i1 m.32695	cell division cycle 48 homolog	1	65,11	0,0399086 32	4,8238300 73
TR26345 c0_g2_i3 m.68327	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta- mitochondrial	1	65,17	0,0430765 84	3,8469242 75
TR27334 c0_g2_i8 m.80762	thiol protease aleurain-like	1	53,47	0,0484128 5	4,5561082 43
TR30115 c1_g1_i4 m.119276	peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	2	148,2 3	0,0121335 05	2,1812649 12
TR20361 c0_g1_i3 m.19832	EXORDIUM	1	71,98	0,0300156 71	2,7552289 72
TR20842 c0_g1_i1 m.22450	heterogeneous nuclear ribonucleo 1	1	41,88	0,0293208 07	2,8738354 23
TR32308 c0_g10_i1 m.156186	PREDICTED: uncharacterized protein At4g28440	2	218,1 6	0,0247361 83	2,9474060 3
TR32795 c1_g1_i5 m.165112	catalase isozyme 2	9	910,9 1	0,0080718 24	1,9787758 41
TR53083 c0_g1_i1 m.199614	germin family	1	72,62	0,0441512 33	3,4097028 47
TR20463 c0_g1_i2 m.20320	elongation factor 1-delta-like	1	44,75	0,0486672 57	4,9314399 19
TR23265 c0_g1_i1 m.37949	desiccation-related At2g46140	5	271,0 9	0,0265012 56	2,5556915 89
TR26042 c0_g1_i2 m.65069	subtilisin-like protease	2	125,1 9	0,0305678 45	2,7094392 84
TR26930 c0_g2_i13 m.75732	flowering locus K homology domain	2	178,2 2	0,0095630 82	1,9531219 96
TR27498 c0_g7_i1 m.82756	10 kDa chaperonin	2	75,23	0,0248479 43	2,5483535 6
TR31975 c2_g1_i8 m.150576	clathrin interactor EPSIN 2	2	114,4 3	0,0291458 7	2,6987361 62
TR18118 c0_g1_i1 m.12222	fasciclin-like arabinogalactan 2	8	444,5	0,0236963 27	2,4771987 59
TR28010 c0_g2_i1 m.89199	peroxidase 5-like	2	87,16	0,0340624 77	2,8969413 24
TR22226 c0_g2_i1 m.30828	monocopper oxidase SKS1	3	177,4 1	0,0056288 57	1,9740609 92
TR12930 c0_g1_i1 m.5687	40S ribosomal S16	1	60,38	0,0467236 43	3,2876393 07
TR24679 c1_g2_i1 m.50771	peroxiredoxin family	4	301,8 9	0,0226242 49	2,3800168 1
TR33647 c0_g1_i2 m.181903	probable Xaa-Pro aminopeptidase P	1	73,3	0,0402157 83	3,1685798 85
TR28941 c0_g3_i5 m.102414	Far upstream element-binding 3	1	52,8	0,0363110 42	2,8638779 49
TR29344 c7_g1_i1 m.107996	RNA polymerase II degradation factor 1	1	62,11	0,0344215 58	1,2755072 57
TR32092 c0_g1_i1 m.152681	polyadenylate-binding 2	5	413,7 3	0,0280118 48	2,5778997 44
TR33302 c1_g1_i1 m.175046	subtilisin-like protease	7	392,0 6	0,0031199 39	1,7855939 57
TR29894 c0_g2_i2 m.115939	heparanase 3	1	58,06	0,0047172 7	1,9085724 74

TR19805 c0_g1_i1 m.17512	isoflavone reductase	13	891,4 1	0,0211542 73	2,5434121 12
TR19863 c0_g1_i2 m.17733	ASPARTIC PROTEASE IN GUARD CELL 2-like	1	32,06	0,0479998 78	2,9357678 93
TR19462 c0_g1_i5 m.16122	40S ribosomal SA	1	148,8 4	0,0244432 84	2,3536354 9
TR30327 c1_g1_i1 m.122847	pectinesterase-like	1	76,51	0,0274356 29	2,3304221 82
TR17657 c0_g1_i1 m.11237	serine carboxypeptidase-like 13	3	199,5 1	0,0348076 44	2,5158726 65
TR22547 c2_g1_i9 m.32867	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38	3	208,1 1	0,0069344 23	1,9190153 59
TR16280 c0_g1_i1 m.9015	enoyl-[acyl-carrier- ] reductase [NADH] chloroplastic-like	2	177,3 5	0,0328185 76	2,5407391 39
TR32982 c0_g2_i1 m.168723	bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase shikimate chloroplastic-like	2	129,9 7	0,0272622 07	2,3315535 45
TR19551 c0_g2_i1 m.16452	basic 7S globulin-like	1	81,87	0,0490802 75	2,8564532 59
TR21574 c0_g1_i5 m.26322	40S ribosomal S8	1	43,5	0,0234303 01	2,3794547 74
TR28467 c0_g4_i3 m.95405	histone	3	268,0 3	0,0186147 07	2,1431481 69
TR32342 c3_g2_i2 m.156872	pollen-specific leucine-rich repeat extensin 1	1	67,26	0,0498907 59	3,0666006 08
TR28729 c1_g1_i4 m.99280	phosphatidylglycerol phosphatidylinositol transfer DDB_G0282179	1	73,91	0,0416615 76	3,0784886 06
TR23511 c0_g1_i5 m.40150	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105125992	1	40	0,0244729 31	2,2211636 35
TR23122 c1_g1_i1 m.36924	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104454644	1	47,15	0,0498610 07	2,7894893 03
TR31235 c3_g1_i2 m.137589	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104445070	1	76,31	0,0339727 79	2,3823574 22
TR22547 c1_g1_i3 m.32848	ubiquitin domain-containing DSK2a-like	2	119,2 1	0,0392737 45	2,9607504 77
TR29065 c0_g3_i5 m.104133	ketol-acid chloroplastic-like	1	40,28	0,0152421 4	2,0272381 63
TR20015 c0_g2_i1 m.18382	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta- chloroplastic	1	72,15	0,0303276 74	2,5464684 41
TR24073 c1_g6_i2 m.45043	formate mitochondrial	2	105,0 4	0,0300651 72	2,1918843 76
TR28762 c0_g1_i7 m.99790	serine carboxypeptidase-like 35	1	94,69	0,0405106 04	2,4843133 63
TR30000 c2_g2_i2 m.117584	pyruvate kinase cytosolic-like	2	123,8 1	0,0115019 69	1,9502300 28
TR24071 c1_g3_i3 m.45019	calnexin homolog	1	27,41	0,0316742 19	1,2970894 63
TR31799 c0_g5_i1 m.147397	quinone-oxidoreductase chloroplastic	1	30,51	0,0272154 03	2,1430059 04
TR29806 c1_g2_i1 m.114471	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP12	1	76,95	0,0404672 33	2,4151577 92
TR30349 c0_g4_i1 m.123232	serine carboxypeptidase-like 18	4	293,6 3	0,0044715 85	1,7015334 32
TR21469 c1_g2_i4 m.25756	60S ribosomal L9	4	321,0 2	0,0389670 56	2,3461512 61
TR21536 c0_g1_i2 m.26080	alpha-1,4-glucan- synthase [UDP-forming] 2-like	2	111,6 4	0,0405754 9	2,6283423 02
TR24303 c0_g1_i2 m.47228	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3	204,4 2	0,0228201 65	2,0377880 17
TR34085 c4_g2_i6 m.190159	40S ribosomal S5	1	79,25	0,0497286 95	2,4533191 1

TR15176 c0_g3_i1 m.7623	40S ribosomal S12-like	2	113,8 5	0,0154037 66	2,0824096 76
TR20438 c0_g1_i5 m.20188	ribulose-phosphate 3- cytoplasmic isoform	1	119,9 2	0,0222020 51	2,0492742 53
TR29862 c0_g7_i2 m.115450	DNA-damage-repair toleration DRT102	1	84,15	0,0462402 71	2,5338368 71
TR27618 c0_g2_i4 m.84296	60S ribosomal L35	1	45,88	0,0311735 26	2,1933049 14
TR26138 c1_g2_i1 m.66131	alanine--glyoxylate aminotransferase 2 homolog mitochondrial	3	269,2 2	0,0244386 07	2,1861791 76
TR23589 c0_g1_i3 m.40727	GDSL esterase lipase At5g14450	1	62,81	0,0394575 49	2,1879304 05
TR15844 c0_g1_i1 m.8457	MFP1 attachment factor 1-like	1	39,12	0,0451524 46	2,1637778 9
TR24608 c0_g1_i1 m.50006	40S ribosomal S2-4	1	71,48	0,0246814 36	2,0265962 47
TR26288 c0_g4_i2 m.67648	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating] mitochondrial	1	54,33	0,0214919 2	2,1313698 11
TR29808 c0_g1_i6 m.114508	PDI-like 1-1 isoform 2	1	56,67	0,0487971 61	2,6135326 36
TR26905 c0_g1_i2 m.75356	3-ketoacyl- thiolase peroxisomal	3	195,6 6	0,0240135 54	1,9456892 56
TR25119 c0_g2_i6 m.55154	T-complex 1 subunit eta	3	168,2 3	0,0150356 09	1,8805294 99
TR19013 c0_g2_i1 m.14812	40S ribosomal S7	2	134,7 2	0,0102278 68	1,7654129 4
TR23295 c0_g1_i8 m.38163	L-ascorbate cytosolic	1	64,63	0,0473036 34	2,2011523 41
TR21786 c0_g3_i3 m.27700	guanine nucleotide-binding subunit beta	1	46,49	0,0460164 66	2,1441979 1
TR25744 c0_g2_i11 m.61922	endo-1,3 1,4-beta-D-glucanase- like	5	496,6 9	0,0367876 99	1,9725300 18
TR16708 c0_g3_i1 m.9566	Copper ion binding isoform 1	3	203,0 3	0,0375627 54	2,0421380 75
TR31547 c0_g4_i4 m.143044	glycine-rich RNA-binding GRP1A-like	6	486,5	0,0215453 83	1,8435982 58
TR31847 c1_g1_i1 m.148278	heat shock 70 kDa mitochondrial	3	190,0 8	0,0226084 06	1,9092172 87
TR29093 c2_g1_i3 m.104482	MULTIFUNCTIONAL family	1	45,94	0,0472871 94	2,0856923 13
TR29353 c0_g1_i1 m.108128	stomatin mitochondrial	1	55,93	0,0178872 91	1,3431103 9
TR25119 c0_g2_i2 m.55148	T-complex 1 subunit eta	1	42,19	0,0356583 52	1,9040064 76
TR21072 c0_g1_i1 m.23492	proteasome subunit alpha type-7	5	327,2 8	0,0136654 5	1,8116213 3
TR11345 c0_g1_i2 m.4656	elongation factor 1-alpha	1	64,39	0,0209932 78	1,7572387 7
TR22647 c1_g3_i2 m.33488	Coatomer subunit delta	1	59,96	0,0206912 47	1,7938573 73
TR24485 c0_g2_i2 m.48790	aldose 1-epimerase	2	112,1	0,0042082 34	1,6402738 98
TR28106 c0_g1_i2 m.90558	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	4	227,8 3	0,0388432 3	1,9576447 09
TR26524 c3_g1_i3 m.70317	acetyl- cytosolic 1	2	139,5 1	0,0156161 37	1,7115161 93
TR32556 c0_g1_i10 m.160895	luminal-binding 5	1	62,69	0,0330511 53	1,8828204 48
TR30095 c1_g1_i1 m.118989	5- methyltetrahydropteroyltrigluta	4	378,8 9	0,0370994 75	1,8333310 72

	mate--homocysteine methyltransferase					
TR12396 c0_g1_i1 m.5315	alcohol dehydrogenase-like 7	1	74,72	0,0461663 25	1,9055262 3	
TR17876 c0_g1_i2 m.11672	malate mitochondrial	8	821,4 3	0,0291233 24	1,3580330 76	
TR28908 c1_g1_i3 m.101739	triosephosphate cytosolic	2	111,2 6	0,0316500 23	1,7135822 18	
TR24073 c1_g6_i7 m.45051	formate mitochondrial	9	491,7 8	0,0228570 62	1,6775093 76	
TR27680 c0_g2_i4 m.85041	Adenosine kinase 2	2	192,0 1	0,0486149 29	1,7479060 91	
TR22087 c0_g1_i2 m.29758	beta-xylosidase alpha-L- arabinofuranosidase 2	14	782,7 1	0,0449173 32	1,7277687 27	
TR24617 c1_g1_i1 m.50071	caffeoylshikimate esterase	2	92,04	0,0126874 09	1,6338590 36	
TR14577 c0_g1_i3 m.7037	asparagine--tRNA cytoplasmic 1	3	178,0 1	0,0079455 42	1,5914972 71	
TR21393 c0_g2_i1 m.25304	CBS domain-containing mitochondrial	1	65,28	0,0447617 05	1,6902114 62	
TR27123 c1_g2_i1 m.78291	2-methylene-furan-3-one reductase-like	7	445,7 5	0,0145730 69	1,3902994 13	
TR20828 c0_g3_i2 m.22366	succinyl- ligase [ADP-forming] subunit mitochondrial	1	68,89	0,0206293 72	1,6478654 14	
TR22998 c0_g1_i2 m.35911	gamma carbonic anhydrase mitochondrial	5	393,4 1	0,0034583 58	1,4345072 62	
TR19925 c0_g2_i1 m.17995	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2-like	1	61,92	0,0455335 07	1,5906875 63	
TR28281 c1_g1_i2 m.92969	probable succinyl- ligase [ADP- forming] subunit mitochondrial	4	281,7 3	0,0070560 76	1,5322573 83	
TR31102 c0_g2_i12 m.135072	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	1	62,97	0,0196870 46	1,5131201 39	
TR22643 c1_g2_i1 m.33451	monothiol glutaredoxin-S10	1	86,8	0,0245199 89	1,4693309 23	
TR29416 c2_g3_i2 m.109034	V-type proton ATPase catalytic subunit A	1	55,72	0,0295173 52	1,4715433 02	
TR29416 c2_g4_i2 m.109038	V-type proton ATPase catalytic subunit A	3	217,1 9	0,0462767 98	1,4826598 47	
TR32703 c2_g1_i2 m.163393	ras GTPase-activating -binding 2	1	52,96	0,0495768 48	1,4466601 63	
TR15262 c0_g1_i2 m.7729	flavanone 3-hydroxylase	2	133,1 1	0,0097433 37	1,5034075 88	
TR20286 c0_g1_i3 m.19497	nucleoside diphosphate kinase	1	47,08	0,0352272 27	708,46169 01	
TR24791 c0_g2_i1 m.52018	non-symbiotic hemoglobin 1	1	33	0,0026089 31	606,73110 23	
TR30872 c0_g2_i12 m.131202	cysteine ase inhibitor-like	1	77,75	0,0230276 87	179,04562 08	
TR33676 c0_g8_i2 m.182310	Disease resistance	1	22,78	0,0157057 59	116,40433 78	

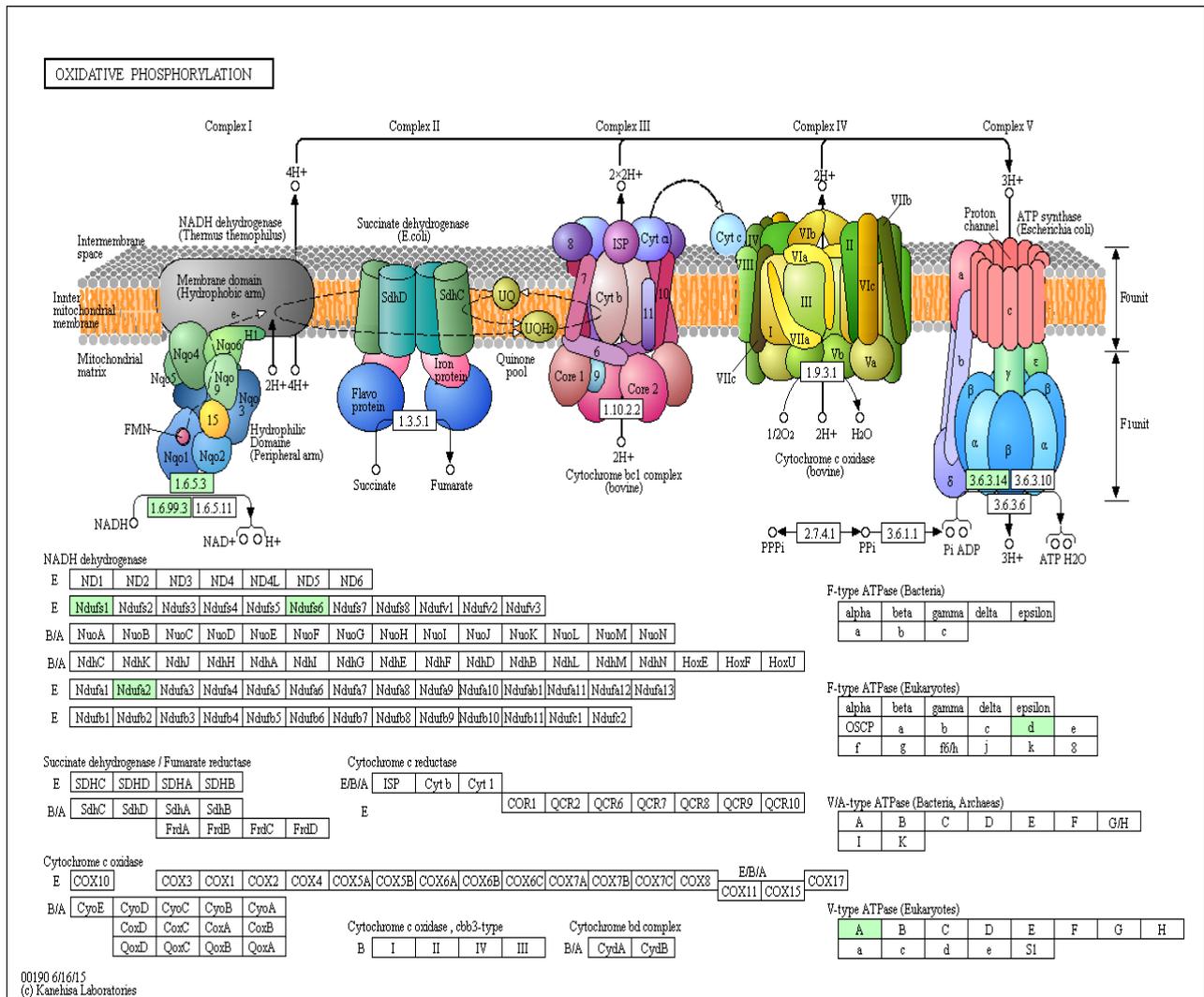
<sup>a</sup>Número de identificação de acordo com o transcriptoma de *Q. grandiflora*. <sup>b</sup>Descrição: busca PEAKS contra a base de dados do NCBI. <sup>c</sup>Quantidade de peptídeos utilizados para a quantificação. <sup>d</sup>Cobertura das sequências. <sup>e</sup>Valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. <sup>f</sup>Proteínas que mostraram uma alteração significativa na abundância (*fold change*) por um fator  $\geq 1,5$ -fold comparado ao controle, analisado pelo *software* Progenesis.

**Anexo 2.** Análise de enriquecimento (STRING) das vias metabólicas a partir das proteínas diferencialmente abundantes em raiz de *Q. grandiflora* que responderam ao tratamento com Al, investigadas utilizando-se a base de dados KEGG.

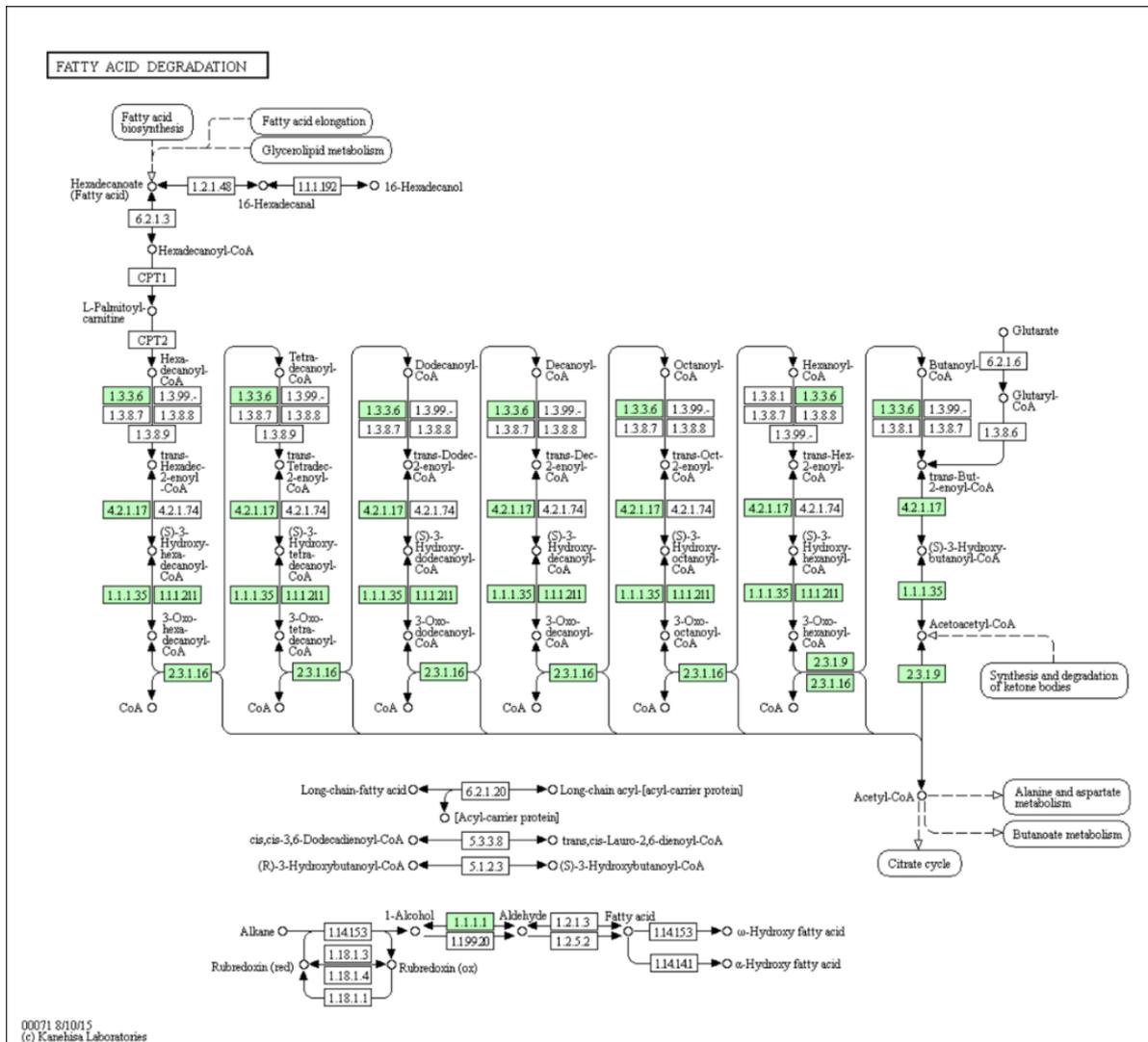
<b>ID via</b>	<b>Descrição da via</b>	<b>N° de proteínas</b>	<b>FDR</b>
<b>3010</b>	Ribosome	21	1.36e-11
<b>20</b>	Citrate cycle (TCA cycle)	8	9.4e-07
<b>630</b>	Glyoxylate metabolism	8	9.4e-07
<b>1230</b>	Biosynthesis of amino acids	14	9.4e-07
<b>71</b>	Fatty acid degradation	7	1.11e-06
<b>1212</b>	Fatty acid metabolism	7	6.74e-05
<b>240</b>	Pyrimidine metabolism	7	0.000814
<b>592</b>	alpha-Linolenic acid metabolism	4	0.00141
<b>270</b>	Cysteine and methionine metabolism	6	0.00209
<b>51</b>	Fructose and mannose metabolism	4	0.0057
<b>640</b>	Propanoate metabolism	3	0.0105
<b>603</b>	Glycosphingolipid biosynthesis - globo series	2	0.0146
<b>260</b>	Glycine, serine and threonine metabolism	4	0.0164
<b>1220</b>	Degradation of aromatic compounds	2	0.0164
<b>760</b>	Nicotinate and nicotinamide metabolism	2	0.0261
<b>4145</b>	Phagosome	4	0.0261
<b>780</b>	Biotin metabolism	2	0.0291
<b>280</b>	Valine, leucine and isoleucine degradation	3	0.0327
<b>480</b>	Glutathione metabolism	4	0.0419
<b>190</b>	Oxidative phosphorylation	5	0.0425
<b>450</b>	Selenocompound metabolism	2	0.0425
<b>30</b>	Pentose phosphate pathway	3	0.0434
<b>230</b>	Purine metabolism	5	0.0457
<b>670</b>	One carbon pool by folate	2	0.0481



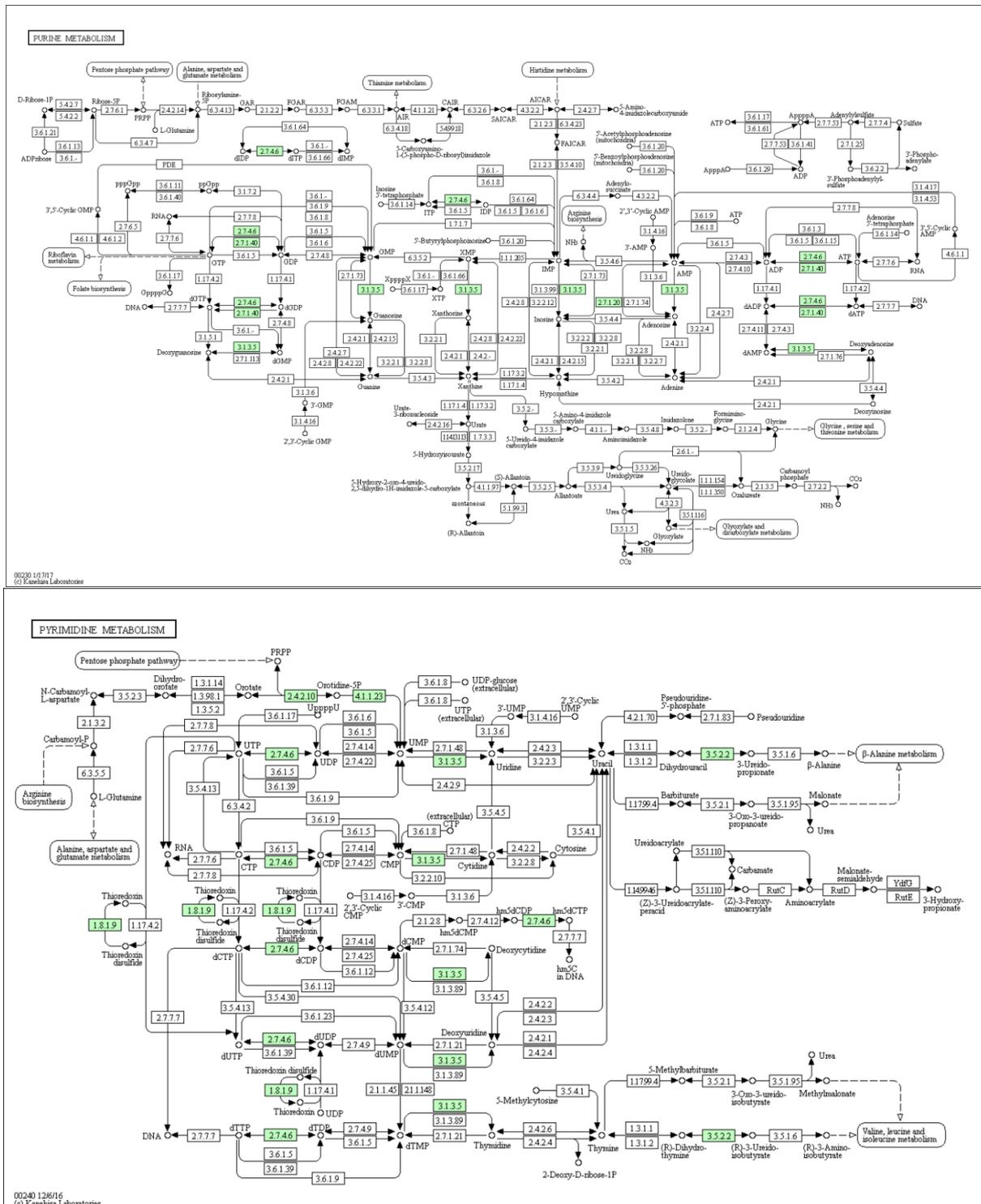
**Anexo 4. Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG.** Um total de 5 proteínas com *fold change*  $\geq 1,5$  reguladas positivamente foram encontradas na via de fosforilação oxidativa em raízes de *Q. grandiflora*.



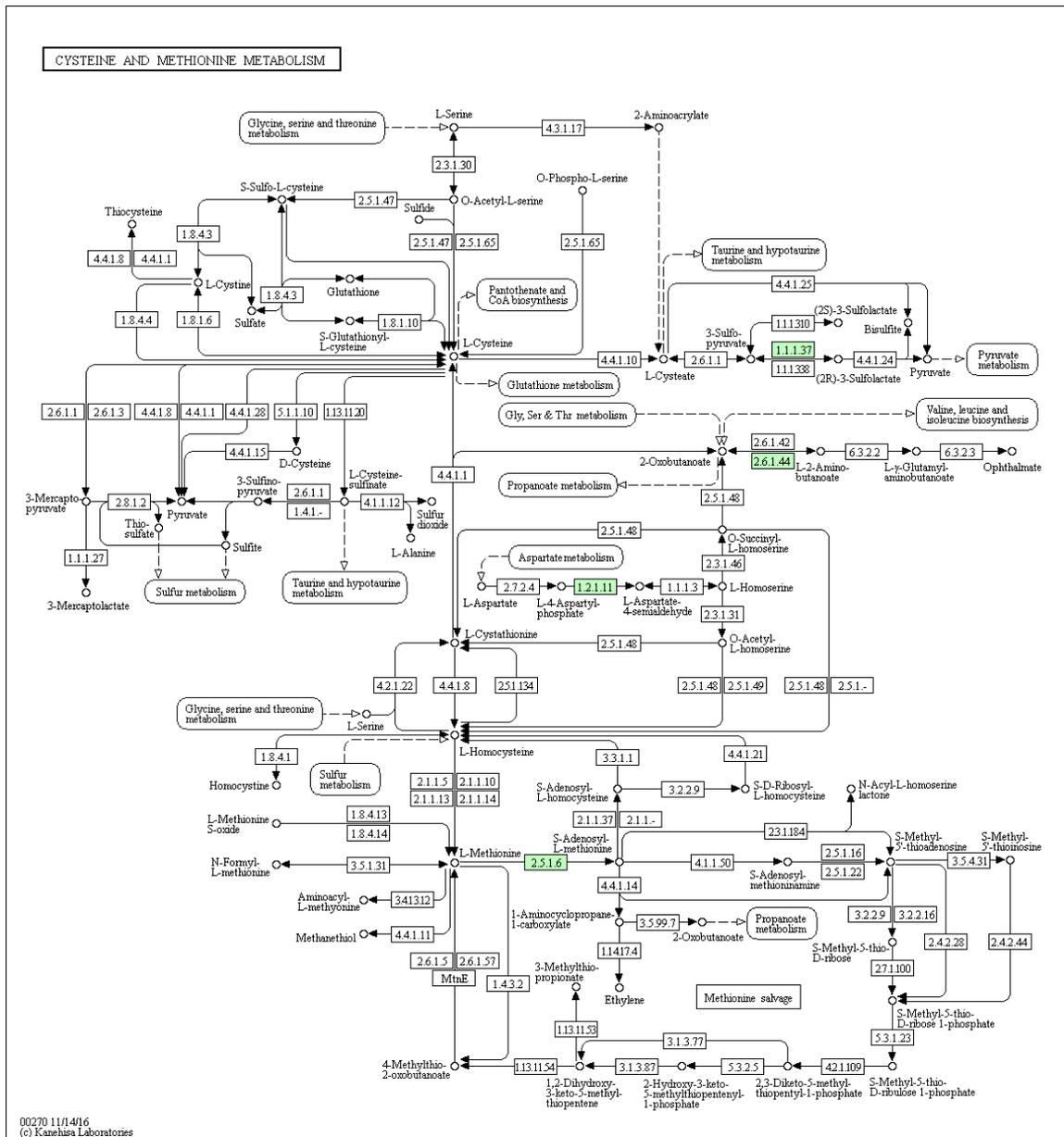
**Anexo 5. Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do AI mapeadas pelo KEGG. Um total de 7 proteínas com *fold change* ≥ 1,5 reguladas positivamente foram encontradas na via de degradação de ácidos graxos em raízes de *Q. grandiflora*.**



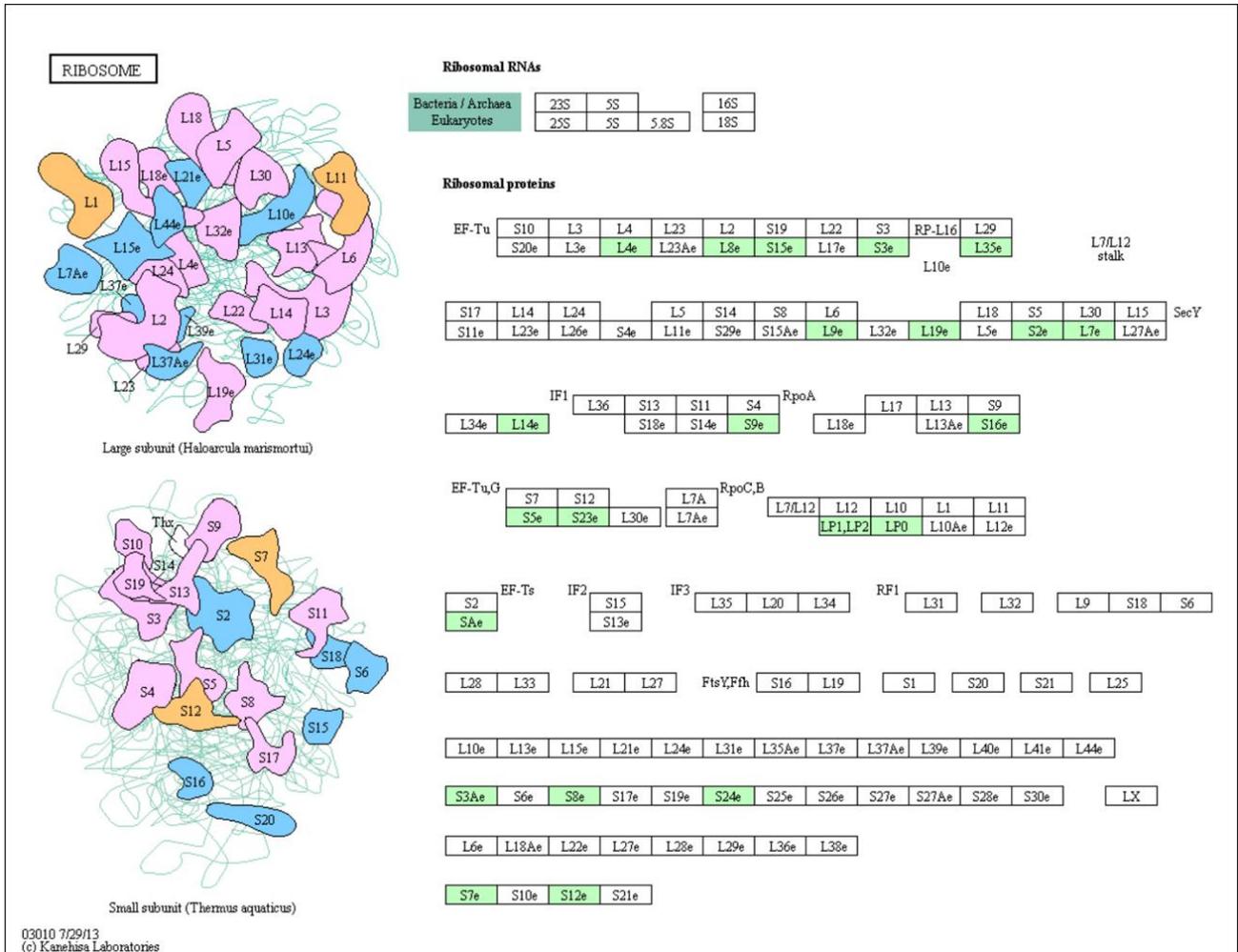
**Anexo 6. Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG. Um total de 12 proteínas com *fold change* ≥ 1,5 reguladas positivamente foram encontradas na via de metabolismo de purina e pirimidina em raízes de *Q. grandiflora*.**



**Anexo 7. Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG. Um total de 6 proteínas com *fold change* ≥ 1,5 reguladas positivamente foram encontradas na via de metabolismo de metionina e cisteína em raízes de *Q. grandiflora*.**



**Anexo 8. Via metabólica das proteínas diferencialmente abundantes responsivas à presença do Al mapeadas pelo KEGG. Um total de 21 proteínas com *fold change* ≥ 1,5 reguladas positivamente foram encontradas na via de atividade ribossômica em raízes de *Q. grandiflora*.**



**Anexo 9.** Proteínas de parede celular reguladas positivamente em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao AI com *fold change*  $\geq 1,5$  a partir de análises LC-MS/MS.

Identificação <sup>a</sup>	Descrição proteína <sup>b</sup>	Nº Peptídeos <sup>c</sup>	Score <sup>d</sup>	Anova (p) <sup>e</sup>	Fold change <sup>f</sup>
TR29204 c0_g1_i2 m.106232	germin 5-1	1	75,93	0,0486	7,1108
TR22237 c0_g1_i1 m.30896	aspartyl protease family	1	58,94	0,0464	6,8635
TR28547 c0_g4_i20 m.96455	alpha-galactosidase 3	1	72,94	0,0159	6,3788
TR26167 c0_g1_i1 m.66375	pectinesterase-like	2	68,46	0,0009	5,4177
TR19582 c0_g1_i1 m.16617	monocopper oxidase SKU5	2	143,06	0,0296	5,3656
TR26941 c3_g1_i5 m.75902	peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional AIM1	1	47	0,0396	5,0731
TR26941 c3_g1_i4 m.75899	peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional AIM1	3	171,31	0,0413	4,2283
TR17521 c0_g1_i1 m.10961	fasciclin-like arabinogalactan 8	1	54,61	0,0044	3,6717
TR53083 c0_g1_i1 m.199614	germin family	1	72,62	0,0442	3,4097
TR26387 c0_g1_i3 m.68703	receptor kinase FERONIA	3	150,03	0,0033	3,1486
TR32128 c1_g1_i2 m.153201	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	1	85,32	0,0169	3,0606
TR23122 c1_g1_i1 m.36924	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104454644	1	47,15	0,0499	2,7895
TR26042 c0_g1_i2 m.65069	subtilisin-like protease	2	125,19	0,0306	2,7094
TR24609 c0_g1_i1 m.50007	subtilisin-like protease	4	253,23	0,0171	2,6801
TR49735 c0_g1_i1 m.198940	probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 7	1	68,22	0,0121	2,3988
TR26629 c0_g2_i3 m.71815	alpha-galactosidase 1	2	97,08	0,0067	2,3475
TR30327 c1_g1_i1 m.122847	pectinesterase-like	1	76,51	0,0274	2,3304
TR23589 c0_g1_i3 m.40727	GDSL esterase lipase At5g14450	1	62,81	0,0395	2,1879
TR29093 c2_g1_i3 m.104482	MULTIFUNCTIONAL family	1	45,94	0,0473	2,0857
TR29065 c0_g3_i5 m.104133	ketol-acid chloroplastic-like	1	40,28	0,0152	2,0272
TR33302 c1_g1_i1 m.175046	subtilisin-like protease	7	392,06	0,0031	1,7856
TR22087 c0_g1_i2 m.29758	beta-xylosidase alpha-L-arabinofuranosidase 2	14	782,71	0,0449	1,7278
TR29416 c2_g3_i2 m.109034	V-type proton ATPase catalytic subunit A	1	55,72	0,0295	1,4715

<sup>a</sup>Número de identificação de acordo com o transcriptoma de *Q. grandiflora*. <sup>b</sup>Descrição: busca PEAKS contra a base de dados do NCBI. <sup>c</sup>Quantidade de peptídeos utilizados para a quantificação. <sup>d</sup>Cobertura das sequências. <sup>e</sup>Valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. <sup>f</sup>Proteínas que mostraram uma alteração significativa na abundância (*fold change*) por um fator  $\geq 1,5$ -*fold* comparado ao controle, analisado pelo *software* Progenesis.

**Anexo 10.** Proteínas relacionadas à capacidade oxirredutora diferencialmente abundantes identificadas em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao AI com *fold change*  $\geq 1,5$  a partir de análises LC-MS/MS.

Identificação <sup>a</sup>	Descrição proteína <sup>b</sup>	N <sup>o</sup> Peptídeos <sup>c</sup>	Score <sup>d</sup>	Anova (p) <sup>e</sup>	Fold change <sup>f</sup>
<b>Proteínas reguladas positivamente</b>					
TR26129 c1_g2_i2 m.66028	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur mitochondrial	1	63,69	0,0388	51,3689
TR30009 c0_g2_i1 m.117710	peroxidase 31-like	1	75,06	0,0146	37,4629
TR34083 c1_g3_i1 m.190141	laccase-14-like isoform X2	1	141,91	0,0059	20,9167
TR25565 c0_g1_i1 m.60257	3-oxo-Delta(4,5)-steroid 5-beta-reductase-like	2	84,46	0,0026	14,3033
TR30195 c2_g2_i2 m.120564	cytochrome b5	1	33,77	0,0265	8,1879
TR32877 c2_g19_i2 m.166789	tropinone reductase homolog At5g06060-like	1	63,85	0,0233	7,6486
TR17020 c0_g1_i1 m.10039	leucoanthocyanidin reductase	1	37,56	0,0282	7,4273
TR29204 c0_g1_i2 m.106232	germin 5-1	1	75,93	0,0486	7,1108
TR30244 c2_g2_i4 m.121334	stromal 70 kDa heat shock-related chloroplastic	1	60,76	0,0483	7,0510
TR31926 c1_g2_i10 m.149588	fructose-bisphosphate aldolase class-II	1	52,37	0,0367	7,0406
TR37322 c0_g1_i1 m.196425	calmodulin	2	131,04	0,0003	6,7571
TR24876 c0_g1_i1 m.52807	cytochrome b5 isoform E	2	83,19	0,0041	6,0113
TR22779 c0_g1_i3 m.34403	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	1	78,85	0,0420	5,4052
TR19582 c0_g1_i1 m.16617	monocopper oxidase SKU5	2	143,06	0,0296	5,3656
TR26941 c3_g1_i5 m.75902	peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional AIM1	1	47	0,0396	5,0731
TR21133 c0_g1_i1 m.23907	peroxidase P7-like	4	298,82	0,0120	4,5184
TR30709 c1_g1_i10 m.128421	alcohol dehydrogenase 1B	1	66,01	0,0259	4,4675
TR26285 c0_g1_i2 m.67626	thioredoxin reductase NTRB-like	5	327,64	0,0021	4,2971
TR26941 c3_g1_i4 m.75899	peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional AIM1	3	171,31	0,0413	4,2283
TR21299 c2_g1_i8 m.24836	laccase-9	4	323,08	0,0023	4,0291

TR27305 c2_g1_i10 m.80412	low-temperature-induced cysteine ase	4	197,82	0,0225	3,9672
TR26345 c0_g2_i3 m.68327	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-mitochondrial	1	65,17	0,0431	3,8469
TR30168 c0_g1_i3 m.120080	probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	1	38,09	0,0284	3,7191
TR32378 c1_g8_i5 m.157490	alcohol dehydrogenase 1	9	553,05	0,0029	3,5063
TR28770 c2_g2_i10 m.99885	zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing 2 isoform X1	1	63,82	0,0103	3,3741
TR28166 c1_g1_i4 m.91521	PITH domain-containing At3g04780	1	40,19	0,0196	3,3011
TR23538 c0_g1_i1 m.40383	peroxidase 12-like	3	201,47	0,0025	3,1678
TR33049 c0_g1_i1 m.170033	probable NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like 1	2	133,24	0,0007	3,1554
TR32906 c2_g2_i1 m.167258	peroxidase 73	1	43,32	0,0144	2,9433
TR28010 c0_g2_i1 m.89199	peroxidase 5-like	2	87,16	0,0341	2,8969
TR32984 c0_g5_i1 m.168749	glutamyl-tRNA reductase-binding chloroplastic	1	69,31	0,0044	2,8774
TR30693 c0_g2_i5 m.128207	malate dehydrogenase	12	745,81	0,0137	2,7460
TR29555 c1_g3_i4 m.110973	stromal 70 kDa heat shock-related chloroplastic	3	165,62	0,0048	2,4602
TR26139 c2_g3_i2 m.66156	malate chloroplastic	4	203,87	0,0017	2,4322
TR24679 c1_g2_i1 m.50771	peroxiredoxin family	4	301,89	0,0226	2,3800
TR33765 c0_g4_i10 m.184208	sorbitol dehydrogenase	2	81,4	0,0052	2,3475
TR32982 c0_g2_i1 m.168723	bifunctional 3-dehydroquinone dehydratase shikimate chloroplastic-like	2	129,97	0,0273	2,3316
TR23295 c0_g1_i8 m.38163	L-ascorbate cytosolic	1	64,63	0,0473	2,2012
TR24073 c1_g6_i2 m.45043	formate mitochondrial	2	105,04	0,0301	2,1919
TR30115 c1_g1_i4 m.119276	peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	2	148,23	0,0121	2,1813
TR22352 c0_g2_i2 m.31607	DSBA oxidoreductase family isoform 1	3	155,12	0,0004	2,1534
TR31799 c0_g5_i1 m.147397	quinone-oxidoreductase chloroplastic	1	30,51	0,0272	2,1430

TR26288 c0_g4_i2 m.67648	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating] mitochondrial	1	54,33	0,0215	2,1314
TR29093 c2_g1_i3 m.104482	MULTIFUNCTIONAL family	1	45,94	0,0473	2,0857
TR27216 c0_g2_i6 m.79415	isocitrate dehydrogenase [NADP]	4	281,64	0,0010	2,0582
TR29065 c0_g3_i5 m.104133	ketol-acid chloroplastic-like	1	40,28	0,0152	2,0272
TR32795 c1_g1_i5 m.165112	catalase isozyme 2	9	910,91	0,0081	1,9788
TR22226 c0_g2_i1 m.30828	monocopper oxidase SKS1	3	177,41	0,0056	1,9741
TR28106 c0_g1_i2 m.90558	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	4	227,83	0,0388	1,9576
TR12396 c0_g1_i1 m.5315	alcohol dehydrogenase-like 7	1	74,72	0,0462	1,9055
TR24073 c1_g6_i7 m.45051	formate mitochondrial	9	491,78	0,0229	1,6775
TR19925 c0_g2_i1 m.17995	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2-like	1	61,92	0,0455	1,5907
TR28281 c1_g1_i2 m.92969	probable succinyl- ligase [ADP-forming] subunit mitochondrial	4	281,73	0,0071	1,5323
TR15262 c0_g1_i2 m.7729	flavanone 3-hydroxylase	2	133,11	0,0097	1,5034
TR22643 c1_g2_i1 m.33451	monothiol glutaredoxin-S10	1	86,8	0,0245	1,4693
TR27123 c1_g2_i1 m.78291	2-methylene-furan-3-one reductase-like	7	445,75	0,0146	1,3903
TR17876 c0_g1_i2 m.11672	malate mitochondrial	8	821,43	0,0291	1,3580
TR27143 c0_g1_i2 m.78583	methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)	1	20,15	0,0104	1,3335
<b>Proteínas reguladas negativamente</b>					
TR25380 c0_g1_i1 m.58196	glutathione S-transferase DHAR2	1	40,91	0,0065	181,0676
TR24169 c0_g1_i8 m.45902	superoxide dismutase [Cu-Zn]	1	215,29	0,0119	60,6199
TR27923 c1_g5_i1 m.87979	quinone oxidoreductase-like	1	46,46	0,0288	49,1053
TR30309 c1_g2_i11 m.122564	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex mitochondrial-like	2	111,31	0,0054	31,4741
TR29421 c1_g1_i3 m.109120	aldehyde dehydrogenase family 2 member C4-like	1	43,98	0,0162	30,5791
TR32665 c0_g2_i1 m.162704	kinesin-like calmodulin-binding isoform X1	1	22,03	0,0130	26,0740

TR23401 c1_g1_i3 m.39092	superoxide dismutase [Cu-Zn]	2	351,21	0,0071	20,0579
TR26953 c1_g1_i1 m.76037	probable NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like 1	2	87,29	0,0261	6,0143
TR32130 c1_g1_i6 m.153264	NADP-dependent malic enzyme	1	65,51	0,0294	5,1516
TR29248 c0_g1_i1 m.106797	heat shock 70 kDa 8	2	103,67	0,0210	4,8898
TR29864 c3_g1_i5 m.115490	dihydrolipoyl dehydrogenase mitochondrial	1	82,95	0,0078	4,8430
TR32283 c1_g5_i3 m.155556	calcium permeable stress-gated cation channel 1-like	1	26,91	0,0422	4,6584
TR34196 c2_g2_i17 m.192522	glyceraldehyde-3-phosphate cytosolic	3	141,58	0,0015	3,8677
TR22287 c0_g1_i5 m.31299	probable L-ascorbate peroxidase chloroplastic isoform X1	2	75,47	0,0294	3,3207
TR21541 c0_g1_i4 m.26124	glutathione chloroplastic	1	56,86	0,0069	3,3086
TR34293 c4_g1_i8 m.194256	probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 isoform X3	1	68,44	0,0474	3,1591
TR19541 c0_g1_i4 m.16411	NAD-dependent malic enzyme 59 kDa mitochondrial	3	148,84	0,0094	2,8417
TR30054 c0_g1_i3 m.118569	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase chloroplastic-like	5	340,4	0,0120	2,6982
TR24965 c1_g2_i1 m.53615	heat shock 70 kDa	7	447,16	0,0159	2,5503
TR23009 c0_g1_i1 m.35959	uncharacterized oxidoreductase At4g09670	3	209,39	0,0039	2,5021
TR22831 c1_g1_i2 m.34707	heat shock cognate 70 kDa 2	1	30,27	0,0022	2,2660
TR30054 c0_g1_i2 m.118568	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase chloroplastic-like	1	51,34	0,0272	1,9433
TR16224 c0_g1_i2 m.8952	peroxiredoxin- mitochondrial	1	41,22	0,0368	1,9150
TR30244 c1_g1_i1 m.121317	heat shock cognate 70 kDa 2	1	55,83	0,0025	1,8952
TR21806 c0_g1_i3 m.27835	monodehydroascorbate reductase	1	54,45	0,0031	1,7728
TR29889 c1_g2_i4 m.115824	betaine aldehyde dehydrogenase chloroplastic	1	44,94	0,0090	1,6051

<sup>a</sup>Número de identificação de acordo com o transcriptoma de *Q. grandiflora*. <sup>b</sup>Descrição: busca PEAKS contra a base de dados do NCBIInr. <sup>c</sup>Quantidade de peptídeos utilizados para a quantificação. <sup>d</sup>Cobertura das sequências. <sup>e</sup>Valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. <sup>f</sup>Proteínas que mostraram uma alteração significativa na abundância (*fold change*) por um fator  $\geq 1,5$ -fold comparado ao controle, analisado pelo *software* Progenesis.

**Anexo 11.** Proteínas ribossomais reguladas positivamente em raízes de *Q. grandiflora* em resposta ao AI com *fold change*  $\geq 1,5$  a partir de análises LC-MS/MS.

Identificação <sup>a</sup>	Descrição proteína <sup>b</sup>	Nº Peptídeos <sup>c</sup>	Score <sup>d</sup>	Anova (p) <sup>e</sup>	Fold change <sup>f</sup>
TR7716 c0_g2_i1 m.2835	40S ribosomal S24-1	1	71,95	0,0498	6,8027
TR31258 c0_g8_i5 m.137996	60S ribosomal L4	2	134,19	0,0151	6,4219
TR26745 c0_g4_i1 m.73245	60S ribosomal L19-1	1	52,9	0,0008	5,5030
TR14841 c0_g1_i5 m.7278	40S ribosomal S15-4	1	134,36	0,0173	5,0738
TR19820 c0_g1_i3 m.17573	60S ribosomal L14-1	1	66,31	0,0229	4,0431
TR12534 c0_g2_i1 m.5387	40S ribosomal S23	1	59,6	0,0304	3,7400
TR24036 c0_g1_i4 m.44587	40S ribosomal S9-2	4	249,5	0,0052	3,3985
TR27352 c0_g1_i2 m.80877	60S acidic ribosomal P0	3	181,94	0,0034	3,3660
TR12930 c0_g1_i1 m.5687	40S ribosomal S16	1	60,38	0,0467	3,2876
TR24414 c0_g1_i2 m.48206	60S ribosomal L8-3	2	100,28	0,0103	2,8108
TR34085 c4_g2_i6 m.190159	40S ribosomal S5	1	79,25	0,0497	2,4533
TR22681 c0_g1_i2 m.33764	40S ribosomal S3	3	232,38	0,0064	2,4284
TR21574 c0_g1_i5 m.26322	40S ribosomal S8	1	43,5	0,0234	2,3795
TR19462 c0_g1_i5 m.16122	40S ribosomal SA	1	148,84	0,0244	2,3536
TR21469 c1_g2_i4 m.25756	60S ribosomal L9	4	321,02	0,0390	2,3462
TR25821 c0_g2_i9 m.62840	40S ribosomal S3a	4	341,55	0,0007	2,3172
TR15176 c0_g3_i1 m.7623	40S ribosomal S12-like	2	113,85	0,0154	2,0824
TR24608 c0_g1_i1 m.50006	40S ribosomal S2-4	1	71,48	0,0247	2,0266
TR19013 c0_g2_i1 m.14812	40S ribosomal S7	2	134,72	0,0102	1,7654
TR22890 c0_g1_i2 m.35175	60S ribosomal L35	1	61,66	0,0079	2,8850
TR18015 c0_g2_i6 m.11990	60S ribosomal L7-4	4	200,8	0,0291	5,4619
TR17614 c0_g1_i2 m.11125	60S acidic ribosomal P2A-like	1	33,77	0,0007	7,0704

<sup>a</sup>Número de identificação de acordo com o transcriptoma de *Q. grandiflora*. <sup>b</sup>Descrição: busca PEAKS contra a base de dados do NCBI. <sup>c</sup>Quantidade de peptídeos utilizados para a quantificação. <sup>d</sup>Cobertura das sequências. <sup>e</sup>Valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. <sup>f</sup>Proteínas que mostraram uma alteração significativa na abundância (*fold change*) por um fator  $\geq 1,5$ -fold comparado ao controle, analisado pelo *software* Progenesis.