

PRODUÇÃO TÉCNICA ITV DS

PROTEÔMICA COMPARATIVA DE *Isoetes cangae* EM CULTIVOS *EX-SITU*

Carlos Alexandre Rocha da Costa

Sidney Vasconcelos do Nascimento

Paulo Henrique de Oliveira Costa

Guilherme Oliveira

Cecílio Frois Caldeira

Rafael Borges da Silva Valadares

BELÉM / PA

NOVEMBRO/2019

Título: Proteômica comparativa de <i>Isoetes cangae</i> em cultivos <i>ex-situ</i>	
PROD. TEC. ITV DS - N018/2019	Revisão
Classificação: () Confidencial () Restrita () Uso Interno (x) Pública	00

Informações Confidenciais - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

Informações Restritas - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

Informações de Uso Interno - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

Informações Públicas - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C837 Costa, Carlos Alexandre Rocha da.

Proteômica comparativa de *Isoetes cangae* em cultivos *ex-situ*. / Carlos Alexandre Rocha da Costa ... [et al.]. -- Belém, 2019.

19 f.: il.

1. Proteômica - Cultivo de plantas. 2. Proteômica - vegetal. 3. Metabolismo - Plantas. I. Nascimento, Sidney Vasconcelos do. II. Costa, Paulo Henrique de Oliveira. III. Oliveira, Guilherme. IV. Caldeira, Cecílio Frois. V. Valadares, Rafael Borges da Silva. VI. Título.

CDD 23. ed. 581.35

RESUMO EXECUTIVO

A espécie *Isoetes cangae* foi recentemente descrita e é restrita a uma população em um lago natural permanente da Serra Sul de Carajás. Segundo os critérios adotados pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), esta espécie pode ser classificada como criticamente ameaçada. Estratégias de conservação estão sendo desenvolvidas para evitar a perda da espécie, incluindo a conservação *ex situ*. No presente estudo, foram analisados os perfis quantitativos de proteínas de *I. cangae* cultivadas em três substratos alternativos (Jiffy®-7, Jiffy®-7&canga e Aqua soil) e no substrato de ocorrência natural da espécie (Lake Sediments), a fim de entender o perfil de expressão dos produtos gênicos em diferentes condições ambientais, bem como analisar qual destes substratos seria o mais adequado para cultivo em comparação ao substrato natural. As plantas foram propagadas no laboratório de cultivo de plantas do ITV e cultivadas em condições controladas durante 10 meses. Uma amostra composta, contendo parte aérea e raízes de duas plantas por tratamento, foi coletada e o proteoma foi analisado em triplicata. No total foram identificadas 638 proteínas. Um total de 103 proteínas apresentou acúmulo diferencial nos tratamentos em relação ao controle. O substrato Aqua Soil foi onde as plantas apresentaram o perfil de proteínas mais próximo ao observado no substrato controle. Proteínas envolvidas no metabolismo fotossintético foram menos acumuladas em plantas cultivadas nos três tratamentos alternativos o que pode estar relacionado a queda de desempenho destas plantas nestes substratos. Este estudo demonstrou que proteínas como α -manosidase, ATPases, bem como aquelas relacionadas a respostas a estresses estresse oxidativo, chaperoninas, heatshocks estão diretamente relacionadas a resposta a estresses abiótico. Além disso, proteínas envolvidas na manutenção da fotossíntese e metabolismo de lipídios também tem sua produção alterada de acordo com as condições de cultivo. Sobretudo, este experimento demonstra que o monitoramento dessas proteínas por espectrometria de massas é viável e pode contribuir para monitorar o desempenho de *Isoetes cangae* em condições naturais ou cultivos *ex-situ*.

Palavras-chave: Estresse em planta. Proteômica. Metabolismo de plantas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	04
2	OBJETIVO.....	05
2.1	OBJETIVO GERAL:	05
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	05
3	MATERIAL E MÉTODOS	05
3.1	MATERIAL VEGETAL	05
3.2	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	07
3.3	DIGESTÃO DE PROTEÍNAS	08
3.4	DESSALINIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	08
3.5	2D-UPLC-MSE.....	09
3.6	BIOINFORMÁTICA	09
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4.1	PERFIL PROTEICO	10
4.2	FOTOSSÍNTESE	12
4.3	DA RESPOSTA AO ESTRESSE AO DESENVOLVIMENTO E REGENERAÇÃO DOS TECIDOS	12
4.4	METABOLISMO DE LIPÍDIOS	14
4.5	TRANSPORTES DE ÍONS.....	15
4.6	PLANTAS CULTIVADAS NOS SUBSTRATOS JIFFY®-7&CANGA E JIFFY®-7 APRESENTARAM MENOR RENDIMENTO	15
5	CONCLUSÃO.....	16
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Isoetes* apresenta mais de 200 espécies conhecidas e amplamente distribuídas (Troia et al., 2016). Espécies de *Isoetes* são típicas de habitats aquáticos ou semiaquáticos, embora existam espécies terrestres e, mesmo apresentando ampla diversidade e distribuição, estas plantas exibem aspectos morfológicos uniformes e são pouco variáveis do ponto de vista molecular (Lársen & Rydin, 2016). As espécies de *Isoetes* são plantas pequenas, perenes e possuem taxas lentas de crescimento, muitas vezes colonizam ambientes com condições nutricionalmente desfavoráveis (Caldeira et al., 2019).

A espécie *Isoetes cangae* é encontrada exclusivamente submersa no lago natural permanente Amendoim, sobre o ecossistema de campo rupestre de crosta de ferro na região da Serra Sul de Carajás, sul do Pará (Pereira et al., 2016; Sahoo et al., 2016). A espécie foi encontrada em localidade situada em área de exploração mineral de ferro e, portanto, foi classificada com base nos critérios da IUCN como criticamente ameaçada (Pereira et al., 2016). Devido à potencial deterioração de seus habitats e às alterações do ciclo hídrico e climatológico na bacia hidrográfica de Rio Itacaiúnas (onde está inserida a Serra dos Carajás) (Souza-Filho et al., 2016), os esforços de conservação são necessários antes do possível declínio populacional de *I. cangae*.

Após a descrição da espécie, o Instituto Tecnológico Vale tem desenvolvido estudos com a finalidade de dar suporte às estratégias de conservação de *I. cangae*. Estes estudos envolvem desde a propagação e cultivo da espécie *ex situ*, até a viabilização do plantio/transferência de *I. cangae* para áreas além do lago Amendoim.

O avanço de técnicas da biologia molecular originou várias tecnologias que são utilizadas para produzir bancos de dados e informações sobre componentes e mecanismos celulares de diversos organismos. Dentre estas tecnologias, a proteômica tem sido amplamente utilizada para identificação e análise de perfis proteicos de organismos sob diferentes condições. A síntese e acúmulo diferencial de proteínas é resultado da expressão gênica, cuja adaptação e dinâmica é influenciada por perturbações externas ou internas, definindo o estado funcional da célula e determinando seus fenótipos (Aebersold & Mann, 2016). Assim, a identificação dos produtos gênicos pode se relacionar a respostas de plantas acometidas por estresses bióticos ou abióticos em diferentes condições ambientais (Kosova et al., 2011; Ji et al., 2018 e Mazzeo et al., 2018).

A análise do acúmulo diferencial de proteínas deve contribuir para o entendimento da maquinaria molecular envolvida na adaptação e sobrevivência de *I. cangae* em diferentes

ambientes. Adicionalmente proteínas envolvidas na resposta a estresse podem ser úteis para o monitoramento do desempenho da planta em cultivos *ex-situ*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL:

Analisar o proteoma diferencial de *I. canga* em três substratos alternativos em comparação com o substrato natural.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter o proteoma de *I. canga* em diferentes condições de cultivo
- Identificar alterações no proteoma relacionadas a adaptação e respostas a estresse em *I. canga*.
- Indicar uma lista de proteínas úteis para o monitoramento de cultivos *ex-situ* de *I. canga*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

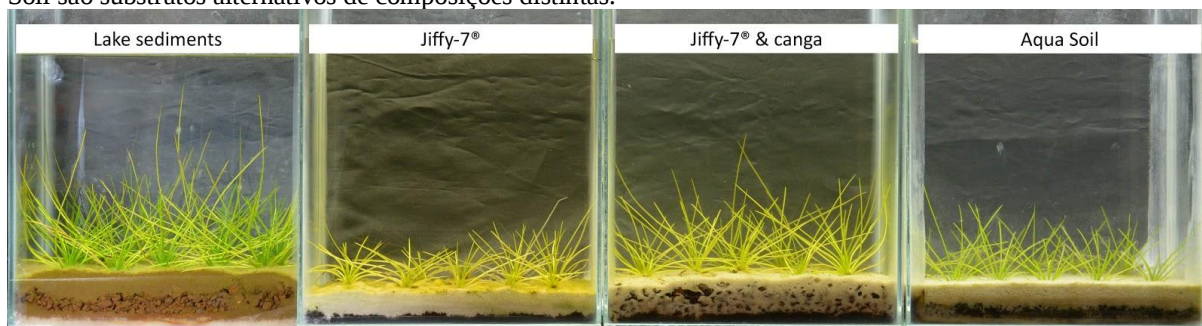
As plantas foram cultivadas em quatro substratos, sendo:

- Lake sediments: sedimentos do lago do Amendoim onde *I. canga* ocorre naturalmente (controle)
- Jiffy-7®: substrato rico em orgânicos com pastilhas Jiffy-7®
- Jiffy-7®&canga: uma mistura de fragmentos de rocha ricos em ferro conhecidos como substratos de canga, mais pellets Jiffy-7®
- Aqual soil: substrato padrão de aquário (Aqua Soil Amazonia)

Os substratos foram dispostos em aquários de 9 dm³ (25x12x30 cm, LxLxH) (Figura 1). O primeiro tratamento foi composto por 0,5 dm³ de sedimentos de lago dispostos sobre 0,5 dm³ de substratos de canga; o segundo recebeu duas pastilhas Jiffy-7® distribuídas homogeneamente e cobertas por 0,8 dm³ de areia de quartzito esterilizada; o terceiro foi composto por uma mistura de duas pastilhas Jiffy-7® com 0,5 dm³ de substrato de canga, cobertas por 0,8 dm³ de areia de quartzito esterilizada; o quarto era de 0,5 dm³ de substrato Aqua Soil coberto por 0,5 dm³ de areia esterilizada de quartzito. Após a disposição do

substrato no fundo, 7 dm³ de água destilada foram adicionados a cada aquário. Os tratamentos foram compostos por 20 esporos, dispostos a 5x5 cm um do outro em dois aquários (10 plantas cada). Todos os esporos foram plantados simultaneamente com uma única folha, com um comprimento total aproximado de 1 cm (comprimento da folha e da raiz). As plantas foram então transferidas para condições ambientais controladas (Fitotron SGC 120, Weiss Technik, Reino Unido) com um fotoperíodo de 12:12 h, densidade de fluxo fotossintético de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e regime de temperatura dia: noite de 28:22 °C. Um filme plástico fino e transparente foi usado para cobrir todos os recipientes de vidro para reduzir a perda de água. Uma pequena abertura (orifício) permitia a troca de gases com o ambiente circundante.

Figura 1 - Plantas da espécie *I. canga* cultivadas em quatro tratamentos em laboratório. O tratamento Lake sediments corresponde ao ambiente natural da espécie. Os tratamentos jiffy®-7, Jiffy®-7&canga e Aqua Soil são substratos alternativos de composições distintas.



Fonte: elaborado pelo autor, (2019).

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As amostras de raízes e folhas de duas plantas cultivadas em cada tratamento foram homogeneizadas para compor uma amostra composta, com o objetivo de eliminar o efeito do genótipo. As proteínas foram isoladas de acordo com protocolo proposto por Wang (2006), onde os grupos de raízes e folhas de cada condição foram maceradas em nitrogênio líquido até atingirem a consistência de um pó fino. Em cada amostra foram adicionados 10 mL de tampão contendo sacarose (1,5 M), Tris-HCL (1 M, pH 8), SDS (dodecilsulfato de sódio, 10%), PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil, 100 mM), PVPP (polivinilpolipirrolidona) e H₂O, com a adição de 100 μL de inibidor de proteases (*Protease Inhibitor cocktail* - P8340 Sigma-Aldrich) e 500 μL de β -mercaptoetanol. As amostras foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente até serem sonicadas por aproximadamente cinco repetições de 30 segundos. Em seguida os extratos foram divididos em dez microtubos cada, adicionando-se 700 μL de fenol por microtubo.

As amostras foram vortexadas por 15 segundos e centrifugadas por oito minutos a 14.000 rpm, para separação da fase fenólica, que foi transferida, sendo as amostras novamente

centrifugadas a 14.000 rpm por oito minutos para eliminar qualquer resíduo da fase aquosa ou de SDS. Foram adicionados 1300 µL de acetato de amônia em metanol para a precipitação das proteínas por aproximadamente 24 horas à -80 °C. Uma nova centrifugação foi realizada a 14.000 rpm por oito minutos, sendo posteriormente descartado o sobrenadante. O precipitado foi transferido para um novo microtubo e lavado por quatro vezes com acetona 80 %. Uma ultima limpeza foi realizada com etanol 70 % e o precipitado foi seco à temperatura ambiente em concentrador à vácuo por aproximadamente sete minutos. Os extratos foram solubilizados em 200 µL de tampão de uréia (7 mol.L⁻¹) e tiouréia (2 mol.L⁻¹). As quantificações de proteínas foram realizadas no fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

3.3 DIGESTÃO DE PROTEÍNAS

A digestão de proteínas foi realizada utilizando 50 µg de proteína de cada amostra, sendo completadas com ureia 8 M para um volume final de 150 µL cada. O preparo para a digestão foi realizado primeiramente com a redução de proteínas com ditioneitol (DTT, 5 mM), incubando-as por 25 minutos a 56 °C, seguida pela alquilação com iodoacetamida (IAA, 14 mM) por 30 minutos em temperatura ambiente. A remoção de IAA residual foi realizada adicionando novamente DTT (5 mM), com incubação de 15 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 1:5 de bicarbonato de amônio (50 mM), seguida pela adição de CaCl (1 mM). O tratamento foi realizado com tripsina (20 ng/µL) por 16 horas à 37 °C. Posteriormente foi adicionado ácido trifluoacético (TFA) na concentração final de 0,4 % do volume das amostras para interromper a reação enzimática.

3.4 DESSALINIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a dessalinização das amostras foram utilizadas colunas *Sep-Pak* C18 de 50 mg de fase sólida e 1 mL de capacidade. As colunas foram ativadas com 3 mL de acetonitrila (ACN, 100 %), em seguida equilibrada com 1 mL de ACN 50 % contendo 0,1 % de ácido fórmico, e 3 mL de ácido trifluoacético 0,1 %. As colunas foram carregadas com as amostras individualmente e lavadas com 3 mL de ácido trifluoacético 0,1 %, sendo equilibradas com 1 mL de ácido fórmico 0,1 %. A eluição foi realizada em 2 mL e 1 mL de ACN 50 % e 80 %, respectivamente, contendo 0,1 % de ácido fórmico. Por fim as amostras foram secas em concentrador a vácuo e ressuspensas em 50 µL de formiato de amônio (10 mM).

3.5 2D-UPLC-MSE

Foi utilizado o cromatógrafo Nano Acquity UPLC (Waters), configurado para um fracionamento em duas dimensões. Para a primeira dimensão foi utilizada uma coluna analítica de 5 μm XBridge™ BEH130 C18 (300 μm x 50 mm) em um fluxo de 2 μL por minuto. A segunda dimensão foi montada com uma coluna *trap* C18, 5 μm (180 μm x 20 mm) e uma coluna analítica 1.7 μm BEH130™ C18 1.8 μm (100 μm x 100 mm) em um fluxo de 400 nL.min⁻¹. As amostras foram separadas em 5 frações a partir de um gradiente de 10.8, 14.0, 16.7, 20.4 e 65.0 % de acetonitrila.

O cromatógrafo foi acoplado diretamente a um espectrômetro de massas ESI-Q-ToF Synapt G2S (Waters) configurado para operar em modo positivo, e fragmentação contínua (MS^E) com a energia de colisão oscilando entre 5 a 40 eV. Foram adquiridos espectros de massas dentro da faixa de 50 a 1200 Da, com *scan* de 0,5 segundos e um intervalo entre *scans* de 0,1 segundos. A largura do pico e resolução dos espectros de massas foram configurados no modo automático. O peptídeo [Glu-1]-fibrinopeptídeo, de massa 785.4827 Da e cargas +2, foi utilizado como referência e lido a cada 30 segundos.

3.6 BIOINFORMÁTICA

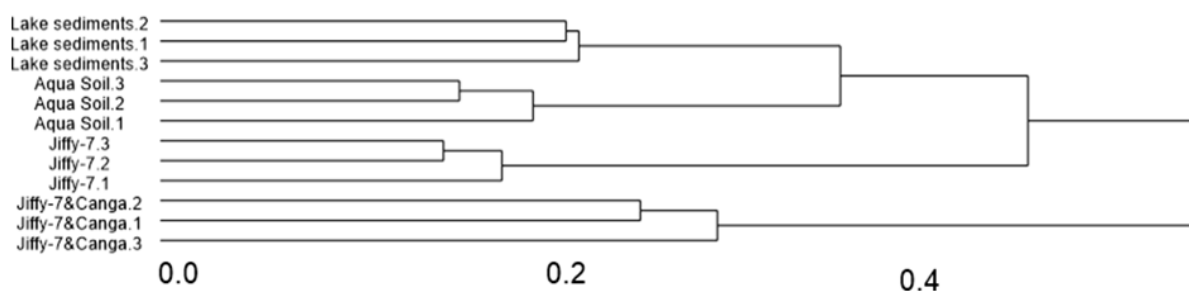
Os dados brutos foram processados com o programa Proteinlynx Global Server (PLGS) 3.0.2, utilizando as base de dados de Uniprot trembl, Uniprot Swissprot (www.uniprot.org) Rnaseq local e *licopodiopsida*, sendo esta última obtida no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A identificação das proteínas foi aceita apenas se a probabilidade de identificação dos peptídeos fosse maior que 90% e as proteínas com 95 %. A validação dos resultados e quantificação relativa foram realizadas no Scaffold 4 (Proteome Software). Neste mesmo programa foi aplicado o modelo ANOVA $p < 0.05$. O *heatmap* e os dendrogramas foram obtidos pelo programa online Heatmapper (<http://www2.heatmapper.ca/expression/>). O método de medição de distância utilizado foi a correlação de Pearson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PERFIL PROTEICO

Foram identificadas 638 proteínas. Dessas, 103 apresentaram acúmulo diferencial com valores significativos ($p < 0.05$) entre as plantas cultivadas nos quatro substratos. Na figura 2 é apresentado o agrupamento hierárquico por níveis de similaridade entre os substratos com base nos proteomas de plantas cultivadas em cada tratamento. Pode ser observado que plantas cultivadas no substrato Aqua Soil apresentaram um perfil de proteínas mais próximo às plantas cultivadas no substrato natural, Lake sediments. No entanto, apesar de plantas cultivadas nestes dois substratos apresentarem diversas proteínas em comum, a maioria dessas proteínas apresentou acúmulo diferencial entre as duas condições. Plantas dos substratos Jiffy®-7 e Jiffy®-7&canga, respectivamente, apresentaram menores similaridades às do natural.

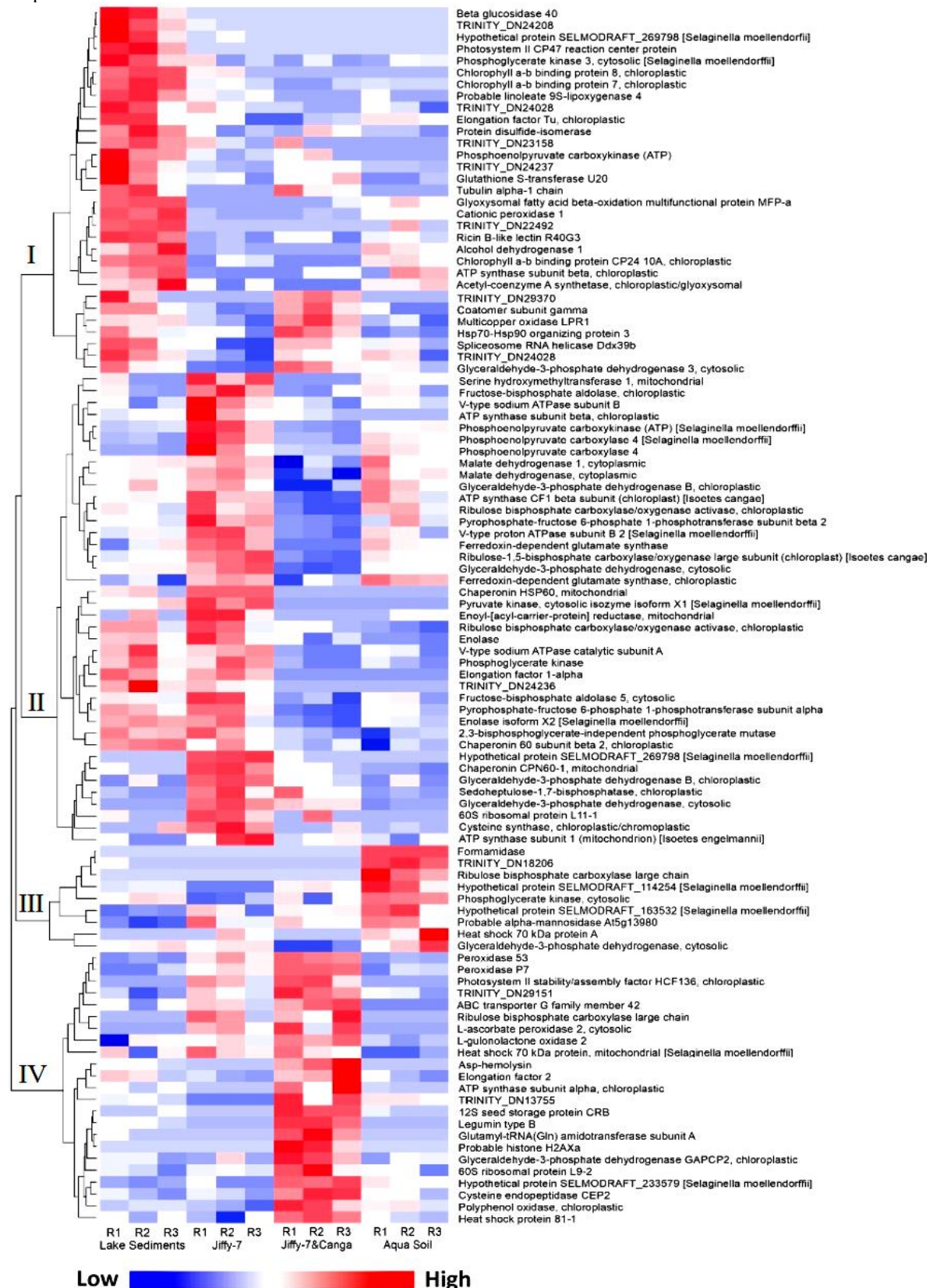
Figura 2 - Agrupamento hierárquico por níveis de similaridade entre os quatro tratamentos. O substrato Aqua Soil apresentou maior similaridade ao natural, Lake sediments.



Fonte: elaborado pelo autor, (2019).

Um *heatmap* foi produzido a partir de informações quantitativas de 103 proteínas que diferiram entre os tratamentos e apresentaram significância estatística no teste de ANOVA ($p < 0.05$) (Figura 3). Um dendrograma de similaridade entre as proteínas evidenciou a presença de quatro grupos protéicos, de acordo com o padrão de expressão apresentado (maior ou menor quantidade de proteínas identificadas em relação ao controle).

Figura 3 - Agrupamento hierárquico de proteínas diferencialmente acumuladas em *I. cangae*. O heatmap foi produzido com 103 proteínas diferencialmente acumuladas (ANOVA $p < 0.05$), divididas em quatro grupos de acordo com as tendências de acúmulos das proteínas. Foram utilizadas três replicatas analíticas para cada tratamento. As cores vermelha e azul representam os maiores e menores valores de intensidade, respectivamente.



Fonte: elaborado pelo autor, (2019).

4.2 FOTOSSÍNTESE

Das cinco proteínas relacionadas à fotossíntese identificadas neste estudo, quatro foram menos acumuladas nos substratos alternativos em relação ao controle (Lake Sediments), tal como observado no grupo I da figura 3. Três delas são proteínas que se ligam a Clorofilas a-b (Chl a-b). A proteína *Photosystem II CP47 reaction center* foi identificada somente no controle. Já a proteína *Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic* foi mais acumulada em Jiffy®-7&canga, sendo identificada também em Jiffy®-7 com menor acúmulo (Figura 3, grupo IV).

A diminuição da síntese destas proteínas nos tratamentos analisados pode estar relacionada com uma diminuição na fotossíntese (Kalteh et al., 2014; Taibi et al., 2016) e conteúdo de clorofila a/b. Estes resultados podem estar relacionados com deficiências em plantas cultivadas nos substratos alternativos, podendo evidenciar a dificuldade na manutenção do metabolismo energético, ocasionando danos a processos biossintéticos e alterações fisiológicas nessas plantas.

4.3 DA RESPOSTA AO ESTRESSE AO DESENVOLVIMENTO E REGENERAÇÃO DOS TECIDOS

Proteínas relacionadas com respostas a estresses foram mais acumuladas em plantas cultivadas nos três tratamentos compostos por substratos alternativos ao natural (Figura 3). Dentre as proteínas, destacam-se as presenças de diversas *heat shock* e *chaperoninas*, conhecidas por suas funções no dobramento de proteínas, estando envolvidas no controle e sinalização do ciclo celular e proteção de células contra diversos estresses ambientais (Li & Srivastava, 2004). Também foram identificadas as proteínas *Peroxidase 53* (PER53), *Peroxidase P7* (PERP7) e *Ascorbate peroxidase* (APX), mais acumuladas em plantas dos substratos Jiffy®-7&canga e Jiffy®-7, e *Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic*, mais acumulada somente em Jiffy®-7&canga.

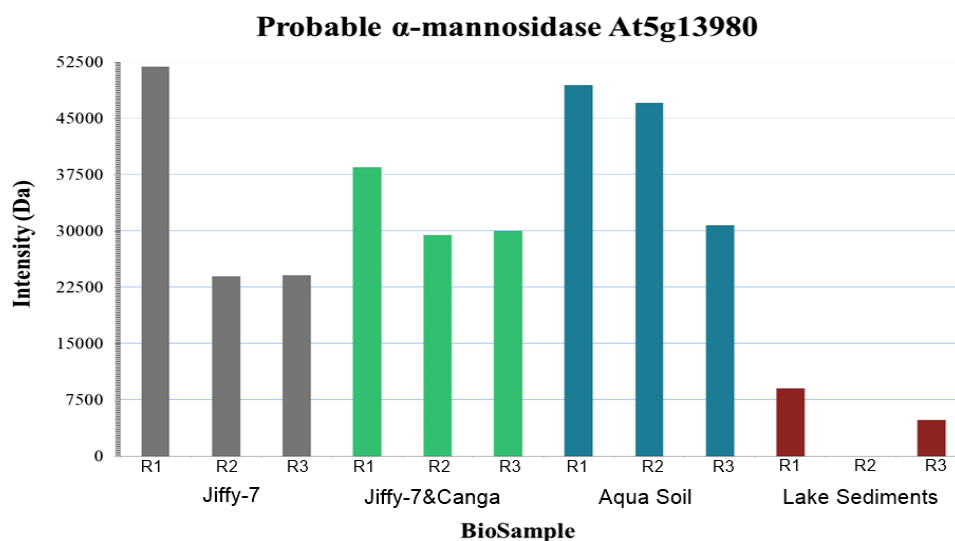
A enzima *L-gulonolactone oxidase 2* foi mais cumulada em plantas do substrato Jiffy®-7&canga, como pode ser observado no grupo IV da figura 3. Esta proteína é responsável pela oxidação de L-gulono-1,4-lactona em ácido ascórbico (AsA). O AsA que é um importante antioxidante não enzimático. Este é altamente abundante e hidrossolúvel, e pode ser cofator de várias enzimas em processos fisiológicos essenciais, como a *Ascorbate peroxidase* citada anteriormente. O AsA influencia positivamente na defesa de plantas contra estresses ambientais (Anjum et al., 2014; Maruta et al., 2010).

Diversos estresses ambientais podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos a estruturas como membranas e a macromoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. As proteínas relatadas acima atuam na mitigação de ROS ao eliminarem o excesso destas moléculas e as mantendo em concentrações celulares normais para evitar danos oxidativos (Diaz-Vivancos et al., 2016). O maior acúmulo destas proteínas nas plantas cultivadas em substratos alternativos deve estar relacionada a adaptação ao meio abiótico e controle do estresse oxidativo ocasionado por condições de estresse.

Os transportadores ABC constituem uma das maiores famílias de proteínas. Em uma célula vegetal, estas proteínas estão localizadas na membrana da própria célula e de suas organelas, onde exercem diversas funções. Entre as diversas funções, transportadores de ABC estão envolvidos em etapas de processos de desintoxicação, sendo também um importante transportador de fitormônios. Assim, elas estão envolvidas em interação da planta com seu ambiente, atuando, portanto, na resposta a estresses abióticos e resistência a patógenos (Lefèvre et al., 2018; An et al., 2019). No presente estudo, *ABC transporter G family member 42* foram mais acumuladas em plantas de Jiffy®-7 e Jiffy®-7&canga (Figura 3, grupo IV), reforçando que plantas cultivadas nestas condições podem estar sob maior influência de estresses, sendo estes dois substratos os menos interessantes para o transplante de *I. cangae*.

A proteína α -manosidase foi a única mais acumulada nos três substratos alternativos (Figura 3, grupo III, e Figura 4). Esta enzima está envolvida na biossíntese de oligossacarídeos ligados a nitrogênio e/ou o *turnover* de N-glicanos no retículo endoplasmático ou complexo de Golgi. (Uno et al., 2010). A α -manosidase é uma enzima da família hidrolase glicosídica, e enzimas desta família atuam na construção, remodelação ou renovação de componentes da parede celular, agindo na defesa contra estresses bióticos ou abióticos (Minic et al., 2007). O acúmulo aumentado desta α -manosidase em *I. cangae* nos 3 substratos analisados deve estar associado a tentativa de sobrevivência das plantas nos substratos testados, considerando o papel desta proteína na biossíntese de parede celular e, consequentemente, dos tecidos de plantas danificadas nestes ambientes.

Figura 4 - Valores da “Probable α -mannosidase At5g13980” em *I. cangae* nos quatro substratos. O gráfico exibe o maior acúmulo da proteína em todos os substratos alternativos (ANOVA $p < 0.05$).



Fonte: elaborado pelo autor, (2019).

4.4 METABOLISMO DE LIPÍDIOS

Plantas cultivadas no substrato natural apresentaram maiores acúmulos de proteínas como *Linoleate 9S-lipoxygenase 4* e *Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP-a*, envolvidas no metabolismo de ácidos graxos (Figura 3, grupo I). *Lipoxygenases* (LOX) catalisam a conversão de ácidos graxos poliinsaturados em hidroperóxidos que, por sua vez, são convertidos em oxilipinas. As oxilipinas são então metabolizadas enzimaticamente em traumatina, ácido jasmônico (JA) e metil jasmonato (MeJA), envolvidos no desenvolvimento, fertilidade, germinação, senescência e respostas a estresses bióticos e abióticos em plantas. Portanto, as oxilipinas desempenham papéis substanciais durante todas as fases da vida vegetal (Hwang et al., 2010; Shaban et al., 2018).

A proteína multifuncional (MFP) atua em conjunto a um complexo de proteínas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos principalmente durante a germinação das sementes (Baker et al., 2006). Neste período de germinação os ácidos graxos podem ser transportados dos corpos lipídicos para os glioxissomos para serem metabolizados. Dessa forma pode ser obtida energia para o desenvolvimento das plântulas. Durante o desenvolvimento da planta, os glioxissomos podem ser transformados em peroxissomos, onde enzimas glioxossômicas são degradadas e novas enzimas são sintetizadas. Essas enzimas irão atuar na síntese de metabólitos secundários como o JA, que também irá atuar resposta a estresses em plantas (Afithile et al., 2005; Su et al., 2019). Nesse contexto, o acúmulo diminuído destas proteínas

nos substratos alternativos deve condizer com o pior desempenho de *I. cangae* neste tratamento.

4.5 TRANSPORTES DE ÍONS

Proteínas do tipo ATPases apresentaram maior acúmulo no substrato Jiffy®-7 (Figura 3, grupo II). O alto acúmulo dessas proteínas em plantas cultivadas neste substratos está provavelmente relacionado a estratégias de sobrevivência em ambientes aquáticos, pois estas desempenham papéis essenciais no transporte de íons e nutrientes. As plantas aquáticas desenvolveram diferentes estratégias para o aumento da captação do CO₂ dissolvido na água, visando o enriquecimento de tecidos e células fotossintéticas. Dentre estas estratégias está o aumento da atividade de ATPases da membrana plasmática (Babourina & Rangel, 2010).

Essas proteínas estão diretamente envolvidas na manutenção do equilíbrio osmótico e integridade da membrana. Quando atuam no vacúolo, geram um gradiente eletroquímico que ativa transportadores secundários envolvidos na captação de íons e metabólitos (Baisakh et al., 2012), estando, assim, envolvidas na sinalização celular em resposta a estímulos (Elmore & Coaker, 2011). Além de atuarem na manutenção de processos celulares, estas proteínas estão relacionadas a respostas a estresses e defesa, onde sua atividade também é aumentada (Gévaudant, et al., 2007; Beyenback & Wiczorek, 2006). Portanto, este resultado pode evidenciar o desenvolvimento de estratégias pelas plantas para tolerar possíveis adversidades as quais foram submetidas nestes substratos, o que torna esta enzima um alvo em potencial para o monitoramento da atividade da planta neste seguimento de pesquisa.

4.6 PLANTAS CULTIVADAS NOS SUBSTRATOS JIFFY®-7&CANGA E JIFFY®-7 APRESENTARAM MENOR RENDIMENTO

Plantas cultivadas nos substratos Jiffy®-7&Canga e Jiffy®-7 apresentaram os piores rendimentos, com reduzida quantidade de pigmentos, menor crescimento vegetativo e menos estruturas reprodutivas (dados não apresentados). No entanto, não é possível afirmar até o momento a quais estresses específicos estão relacionados os acúmulos diferenciados das proteínas identificadas e destacadas neste estudo. Considerando os resultados obtidos, estas proteínas podem futuramente integrar um grupo de proteínas a serem monitoradas em estudos de conservação de *I. cangae*.

5 CONCLUSÃO

Monitorar o acúmulo diferencial de proteínas como α -manosidase e ATPases, bem como de proteínas relacionadas a respostas a estresses, como aquelas envolvidas na mitigação de ROS, chaperoninas, heatshocks, ou envolvidas na manutenção da fotossíntese, deve auxiliar na identificação de condições adversas a *I. cangae* em substratos não naturais da espécie, visto que estas proteínas atuam em mecanismos fundamentais para a sobrevivência e adaptação de plantas. Neste estudo, os perfis proteicos de plantas cultivadas em três substratos analisados mostraram acúmulo diferencial de proteínas envolvidas em processos metabólicos fundamentais à sobrevivência e adaptação de plantas, indicando possíveis prejuízos a estas plantas. Assim, esta ferramenta de análise molecular deve contribuir para a identificação de condições mais favoráveis para o transplântio *ex situ* de *Isoetes cangae*.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, v. 537, n. 762, p. 347-355. 2016.
- AFITLHILE, M. M.; FUKUSHIGE, H.; NISHIMURA, M.; HILDEBRAND, D.F. A defect in glyoxysomal fatty acid β -oxidation reduces jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 603-609, jun. 2005.
- LINJUN, AN; *et al.* Preliminary Classification of the ABC Transporter Family in *Betula halophila* and Expression Patterns in Response to Exogenous Phytohormones and Abiotic Stresses. **Forests**, v. 10, n. 9, 2019.
- ANJUM, N. A.; GILL, S. S.; GILL, R.; HASANUZZAMAN, M.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; AHMAD, I.; TUTEJA, R.; TUTEJA, N. Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. **Protoplasma**, v. 251, n. 6, p. 1265-1283, mar. 2014.
- BABOURINA, O.; RENGEL, Z. Ion Transport in Aquatic Plants. **Waterlogging Signalling and Tolerance in Plants**, p. 221-238. 2010.
- BAISAKH, N.; RAMANARAO, M. V.; RAJASEKARAN, K.; SUBUDHI, P.; JANDA, J.; GALBRAITH, D.; VANIER S.; PEREIRA, A. Enhanced salt stress tolerance of rice plants expressing a vacuolar H^+ -ATPase subunit c1 (SaVHAc1) gene from the halophyte grass *Spartina alterniflora* L. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 4, p. 453-464, maio, 2012.
- BEYENBACH, K. W.; WIECZOREK, H. The V-type H^+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 4, p. 577-589. 2006.
- BAKER, A.; GRAHAM, I. A.; HOLDSWORTH, M.; SMITH, S. M.; THEODOULOU, F. L. Chewing the fat: β -oxidation in signalling and development. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 3, p. 124-132, mar. 2006.
- CALDEIRA, C. F.; ABRANCHES, C. B.; GASTAUER, M.; RAMOS, S. J.; GUIMARÃES, J. T. F.; PEREIRA, J. B. S.; SIQUEIRA J. O. Sporeling regeneration and ex situ growth of *Isoetes cangae* (Isoetaceae): initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort, **Aquatic Botany**, v. 152, p. 1-70, jan. 2019.
- DIAZ-VIVANCOS, P.; FAIZE, L.; NICOLÁS, E.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; BRU-MARTINEZ, R.; BURGOS, L.; HERNÁNDEZ, J. A. Transformation of plum plants with a cytosolic ascorbate peroxidase transgene leads to enhanced water stress tolerance. **Annals of Botany**, v. 117, n. 7, p. 1121-1131, jun. 2016.
- ELMORE, J. M.; COAKER, G. The Role of the Plasma Membrane H^+ -ATPase in Plant-Microbe Interactions. **Molecular Plant**, v. 4, n. 3, p. 416-427, fev. 2011.
- GEVAUDANT, F.; DUBY, G.; VON STEDINGK, E.; ZHAO, R.; MORSOMME, P.; BOUTRY, M. Expression of a Constitutively Activated Plasma Membrane H^+ -ATPase Alters

Plant Development and Increases Salt Tolerance. **Plant Physiology**, v. 144, n. 4, p. 1763-1776. 2007.

HWANG, I. S.; HWANG, B. K. The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. **Plant Physiology**, v. 152, p. 948-967, fev. 2010.

JI, F. S.; TANG, L.; LI, Y. Y.; WANG, W. C.; YANG, Z.; LI, X. G.; ZENG, C. Differential proteomic analysis reveals the mechanism of *Musa paradisica* responding to salt stress. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p. 1057-1068, dez. 2018.

JITHESH, M. N.; PRASHANTH, S. R.; SIVAPRAKASH, K. R.; PARIDA, A. K. **Journal of Genetics**, v. 85, p. 237, dez. 2006.

KALTEH, M.; ALIPOUR, Z. T.; ASHRAF, S.; ALIABADI, M. M.; NOSRATABADI, A. F. Effect of silica Nanoparticles on Basil (*Ocimum basilicum*) Under Salinity Stress. **Journal of Chemical Health Risks**, v. 4, n. 3, p. 49-55, jul. 2014.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 8, p. 1301-1322, fev. 2011.

LARSÉN, E.; RYDIN, C. Disentangling the Phylogeny of *Isoetes* (Isoetales), Using Nuclear and Plastid Data. **International Journal of Plant Sciences**, v. 177, n. 2, p. 157-174, fev. 2016.

LEFÈVRE, F.; BOUTRY, M. Towards identification of the substrates of ATP-binding cassette transporters. **Plant Physiology**, v. 178, n. 1, p. 18-39, set. 2018.

LI, D. Z.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 11, p. 614-621, nov. 2009.

LI, Z.; SRIVASTAVA, P. Heat-Shock Proteins. **Current Protocols in Immunology**, Appendix 1, Appendix 1T, fev. 2004.

LIU, C.; NIU, G.; ZHANG, H.; SUN, Y.; SUN, S.; YU, F.; LU, S.; YANG, Y.; LI, J.; HONG, Z. Trimming of N-glycan by Golgi α 1,2 Mannosidases MNS1 and MNS2 is Crucial for Maintaining RSW2 Protein Abundance Against Salt Stress in Arabidopsis. **Molecular Plant**, v. 11, n. 5, p. 678-609, mai. 2018.

MARUTA, T.; ICHIKAWA, Y.; MIEDA, T.; TAKEDA, T.; TAMOI, M.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, I.; SHIGEOKA, S. The Contribution of Arabidopsis Homologs of L-Gulonolactone Oxidase to the Biosynthesis of Ascorbic Acid. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 7, p. 1494-1497, jul. 2010.

MAZZEO, M. F.; CACACE, G.; IOVIENO, P.; MASSARELLI, I.; GRILLO, S.; SICILIANO, R. A. Response mechanisms induced by exposure to high temperature in anthers from thermo-tolerant and thermo-sensitive tomato plants: A proteomic perspective. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0201027, jul. 2018.

- MINIC, Z.; JAMET, E.; NÉGRONI, L.; GARABEDIAN, P. A. D.; ZIVY, M.; JOUANIN, L. A sub-proteome of *Arabidopsis thaliana* mature stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 10, p. 2503-2512, maio 2007.
- PEREIRA, J. B. D. S.; SALINO, A.; ARRUDA, A.; STÜTZEL, T. Two New Species of *Isoetes* (Isoetaceae) from northern Brazil. **Phytotaxa**, v. 272, n. 2, p. 141, ago. 2016.
- SAHOO, P. K.; GUIMARÃES, J. T. F.; SOUZA-FILHO, P. W. M.; SILVA, M. S. D.; JÚNIOR, R. O. S.; PESSIM, G.; MORAES, B. C. D.; PESSOA, P. F. P.; RODRIGUES, T. M.; COSTA, M. F. D.; DALL'AGNOL, R. Influence of seasonal variation on the hydro-biogeochemical characteristics of two upland lakes in the Southeastern Amazon, Brazil. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 4, p. 2211-2227, ago. 2016.
- SEBBENN, A. M.; FREITAS, M. L. M.; ZANATTO, A. C. S.; MORAES, E.; MORAES, M. A. D. Conservação ex situ e pomar de sementes em banco de germoplasma de *Balfourodendron riedelianum*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 19, p. 101-112, jan. 2007.
- SHABAN, M.; AHMED, M. M.; SUN, H.; ULLAH, A.; ZHU, L. Genome-wide identification of lipoxygenase gene family in cotton and functional characterization in response to abiotic stresses. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 599, ago. 2018.
- SOUZA-FILHO, P. W. M.; DE SOUZA, E. B.; SILVA JÚNIOR, R. O.; NASCIMENTO, W. R.; MENDONÇA, B. R. V.; GUIMARÃES, J. T. F.; DALL'AGNOL, R.; SIQUEIRA, J. O. Four decades of land-cover, land-use and hydroclimatology changes in the Itacaiúnas River watershed, southeastern Amazon. **Journal of Environmental Management**, v. 167, p. 175-184. 2016.
- TONG, Su; WENJING, Li; PINGPING, Wang; CHANGLE, Ma. Dynamics of peroxisome homeostasis and its role in stress response and signaling in plants. **Frontiers in Plant Science**. 2019.
- TAÏBI, K.; TAÏBI, F.; ABDERRAHIM, L. A.; ENNAJAH, A.; BELKHODJA, M.; MULET, J. M. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 306-312, mar. 2016.
- TROIA, A.; PEREIRA, J. B.; KIM, C.; TAYLOR, W. C. The genus *Isoetes* (Isoetaceae): a provisional checklist of the accepted and unresolved taxa. **Phytotaxa**, v. 277, n. 2, p. 101, set. 2016.
- UNO, Y.; HASHIDUME, S.; KURITA, O.; FUJIWARA, T.; NOMURA, K. *Dioscorea opposita* Thunb. α -mannosidase belongs to the glycosyl hydrolase family 38. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 4, p. 713-718, jan. 2010.
- ZHU, T.; XIN, F.; WEI, S.; LIU, Y.; HAN, Y.; XIE, J.; DING, Q.; MA, L. Genome-wide identification, phylogeny and expression profiling of class III peroxidases gene family in *Brachypodium distachyon*. **Gene**, v. 700, p. 149-162, jun. 2019.