

EFEITO DO SULFATO DE FERRO (II) NA GERMINAÇÃO E NA
ALTERAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO, HORMONAL E
NUTRICIONAL EM PLÂNTULAS DE *Albizia lebbbeck* (L.) BENTH

JOCIEL NASCIMENTO DE NORONHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –
UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO, 2024

EFEITO DO SULFATO DE FERRO (II) NA GERMINAÇÃO E NA
ALTERAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO, HORMONAL E
NUTRICIONAL EM PLÂNTULAS DE *Albizia lebbek* (L.) BENTH

JOCIEL NASCIMENTO DE NORONHA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientadora: Prof.^a Dra. Claudete Santa Catarina
Coorientador: Dr. Tadeu dos Reis de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO, 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

N852

Noronha, Jociel Nascimento de.

Efeito do sulfato de ferro (II) na germinação e na alteração do perfil proteômico, hormonal e nutricional em plântulas de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth / Jociel Nascimento de Noronha. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

89 f. : il.

Bibliografia: 49 - 62.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2024.
Orientadora: Claudete Santa Catarina.

1. Proteômica comparativa. 2. Contaminação ambiental. 3. Toxicidade por Fe. 4. Hormônios vegetais. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

EFEITO DO SULFATO DE FERRO (II) NA GERMINAÇÃO E NA
ALTERAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO, HORMONAL E
NUTRICIONAL EM PLÂNTULAS DE *Albizia lebbbeck* (L.) BENTH

JOCIEL NASCIMENTO DE NORONHA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em 26 de fevereiro de 2024

Comissão Examinadora:

Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre (D.Sc., Fitotecnia – Produção Vegetal) – UFES

Prof.^a Marta Simone Mendonca Freitas (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof. Vitor Batista Pinto (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF

Dr. Tadeu dos Reis de Oliveira (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF
(Coorientador)

Prof.^a Claudete Santa Catarina (D.Sc., Biotecnologia) – UENF
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, João Batista (*in memoriam*) e Ivete Araújo, pelos inestimáveis ensinamentos e ao amor que sempre me concederam;

À minha amada família, em especial às minhas irmãs Ivanete, Janeide e Ivaneide, expresso profunda gratidão pelo constante apoio, cuidado e incentivo ao longo de minha jornada acadêmica;

À minha orientadora, Dra. Claudete Santa Catarina, expresso meus sinceros agradecimentos pelos valiosos ensinamentos e orientação ao longo do mestrado;

Ao meu coorientador, Dr. Tadeu dos Reis de Oliveira, pelo constante apoio e disponibilidade em auxiliar-me durante a execução deste trabalho;

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT), compartilho minha gratidão pelo apoio mútuo e pelos bons momentos vivenciados;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do mestrado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e a todos os professores, expresso minha gratidão pelos valiosos ensinamentos transmitidos ao longo do curso;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Espécie de estudo	3
2.2. Influência dos metais traço na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas	4
2.3. Efeito do Fe no crescimento de plantas	5
2.4. Análise do perfil proteômico vegetal em resposta ao estresse por Fe ²⁺	8
2.5. Conteúdo endógeno de hormônios vegetais em resposta ao estresse por metais traço	9
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo geral	12
3.2. Objetivos específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Efeito do sulfato de ferro na germinação e crescimento de plântulas	13
4.2. Análise de dados proteômicos.....	14
4.3. Análise de pigmentos fotossintéticos.....	17
4.4. Análise de hormônios vegetais.....	188
4.5. Determinação do conteúdo de nutrientes	19
4.6. Análise estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21

5.1. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) na germinação de sementes e no crescimento de plântulas.	21
5.2. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) no perfil proteômico.....	24
5.3. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) nos pigmentos fotossintéticos.	32
5.4. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) nos conteúdos endógenos de AIA, ABA, GA, JA, SA e ACC em plântulas.	33
5.5. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) no conteúdo de nutrientes..	33
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
APÊNDICE.....	62

RESUMO

NORONHA, Jociel Nascimento de; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro 2024; Efeito do sulfato de ferro (II) na germinação e alteração do perfil proteômico, hormonal e nutricional em plântulas de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth; Orientadora: D.Sc. Claudete Santa Catarina; Coorientador: D.Sc. Tadeu dos Reis de Oliveira.

O Brasil tem enfrentado graves tragédias ambientais devido ao rompimento de barragens compostas principalmente por rejeitos de óxido de ferro e sílica, resultando na contaminação do meio ambiente com milhões de metros cúbicos de rejeitos. Nesse contexto, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência de diferentes concentrações de sulfato de ferro (II) na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *Albizia lebbbeck*, investigando as alterações no perfil proteômico, conteúdo endógeno de hormônios vegetais, pigmentos fotossintéticos e no teor de nutrientes. As sementes foram germinadas em diferentes concentrações (0, 2, 4, 8, 16, 24 e 32 mM) de sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Após 12 dias de incubação nessas concentrações, foram avaliados a matéria fresca (MF) e seca (MS) e foram coletadas amostras para análises proteômicas, hormonais, pigmentos fotossintéticos e nutrientes. Foi observado que as maiores concentrações (16, 24 e 32 mM) de sulfato de ferro (II) afetaram negativamente a germinação e o crescimento das plântulas. A análise proteômica realizada em plântulas tratadas com 0, 4 e 24 mM possibilitou a identificação de 363 proteínas

na comparação entre as plântulas tratadas com 4 mM e com o controle (4/0 mM), 352 proteínas comparando 24 mM com o controle (24/0 mM) e comparado 24 mM com 4 mM (24/4 mM). Na comparação 4/0 mM o perfil proteômico das plântulas foi semelhante, enquanto nas comparações com a maior concentração de sulfato de ferro (II) com plântulas do controle (24/0 mM) e com 4 mM (24/4 mM), observou-se um aumento no acúmulo de proteínas envolvidas nos processos de resposta ao estresse oxidativo, tais como a glutathione peroxidase e a glutathione S-transferase. Além disso, verificou-se uma diminuição no acúmulo da proteína malato desidrogenase, relacionada ao ciclo de Krebs, e das proteínas potenciadoras da evolução do oxigênio, juntamente com proteínas de ligação clorofila *ab* do complexo antena, as quais podem estar associadas a danos no aparato fotossintético. O aumento nas concentrações de sulfato de ferro (II) levou a uma diminuição significativa no conteúdo de clorofilas e carotenoides. A concentração de 24 mM de sulfato de ferro (II), que inibiu o crescimento das plântulas, deve-se em parte a redução dos níveis endógenos de auxina, ácido abscísico, ácido jasmônico e ácido salicílico, e aumento dos níveis do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), quando comparada ao grupo controle e à concentração de 4 mM. O sulfato de ferro (II) aumentou o teor de ferro, manganês, magnésio e enxofre nas raízes em 4 mM e 24 mM, comparativamente ao controle. Esses resultados ampliam a compreensão dos efeitos do sulfato de ferro (II) na germinação e crescimento inicial de plântulas de *A. lebbbeck*, além de destacar o potencial uso dessa espécie em programas de recuperação de áreas contaminadas com ferro, demonstrando sua capacidade de crescimento em concentrações de até 8 mM.

ABSTRACT

NORONHA, Jociel Nascimento de; M.Sc.; State University of North Fluminense Darcy Ribeiro; February 2024; The effect of iron (II) sulfate on germination and changes in proteomic, hormonal, and nutritional profile in seedlings of *Albizia lebbbeck* (L.) Benth; Advisor: D.Sc. Claudete Santa Catarina; Co-advisor: D.Sc. Tadeu dos Reis de Oliveira.

Brazil has been facing serious environmental tragedies due to the rupture of dams primarily composed of iron oxide and silica residues, resulting in environmental contamination with millions of cubic meters of waste. In this context, this study aimed to evaluate the influence of different concentrations of iron (II) sulfate on the germination of seeds and the development of *Albizia lebbbeck* seedlings, investigating changes in the proteomic profile, endogenous content of plant hormones, photosynthetic pigments, and nutrient content. The seeds were germinated in different concentrations (0, 2, 4, 8, 16, 24, and 32 mM) of iron (II) sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). After 12 days of incubation, fresh (FW) and dry (DW) matter were evaluated, and samples were collected for proteomic, hormonal, photosynthetic pigment, and nutrient analyses. Was observed that higher concentrations (16, 24, and 32 mM) of iron (II) sulfate negatively affected seed germination and seedling growth. Proteomic analysis conducted on seedlings treated with 0, 4, and 24 mM enabled the identification of 363 proteins comparing seedlings treated with 4 mM and the control (4/0 mM), 352 proteins comparing 24

mM with the control (24/0 mM) and comparing 24 mM with 4 mM (24/4 mM). In the comparison 4/0 mM, the proteomic profile of the seedlings was similar, while in the comparisons of a higher concentration of iron (II) sulfate with control (24/0 mM) and with 4 mM seedlings (24/4 mM), there was an increase in the accumulation of proteins involved in oxidative stress response processes, such as glutathione peroxidase and glutathione S-transferase. Additionally, a decrease in the accumulation of malate dehydrogenase protein related to the Krebs cycle and oxygen-evolving enhancer protein 1, along with chlorophyll binding proteins of the antenna complex, which may be associated with damage to the photosynthetic apparatus, was observed. The increase in iron (II) sulfate concentrations led to a significant decrease in chlorophyll and carotenoid contents. The concentration of 24 mM of iron (II) sulfate, which inhibited seedling growth, also resulted in the reduction of endogenous levels of auxin, abscisic acid, jasmonic acid, and salicylic acid, and increased levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, when compared to the control group and the concentration of 4 mM. Iron (II) sulfate increased the content of iron, manganese, magnesium, and sulfur in the roots at 4 mM and 24 mM, compared to the control. These results enhance understanding of the effects of iron (II) sulfate on the germination and initial growth of *A. lebeck* seedlings, highlighting the promising potential of using this species in programs for the recovery of areas contaminated with iron, demonstrating its growth capacity at concentrations of up to 8 mM.

1. INTRODUÇÃO

A atividade de mineração emerge como uma das principais fontes do acúmulo de elementos químicos potencialmente tóxicos no meio ambiente (Andrade et al., 2018). O ano de 2015 ficou marcado pelo maior desastre ambiental até então registrado no país, quando ocorreu o rompimento da barragem de Fundão, localizada no município de Mariana, no estado de Minas Gerais (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, 2015; Segura et al., 2016; Carmo et al., 2017). Em 2019, outra tragédia de proporções significativas impactou os âmbitos social, ambiental e econômico, com o colapso da barragem do Córrego do Feijão, situada na cidade de Brumadinho, também em Minas Gerais. Esses dois acontecimentos resultaram no lançamento massivo de aproximadamente 58 milhões de metros cúbicos de rejeitos de minério de ferro no meio ambiente, compostos principalmente por elementos como Fe, Mn, Cr, Zn, Ni, Cu, Pb e Co (Queiroz et al., 2018).

O Fe é um micronutriente essencial para as plantas, necessário para diversos processos vitais que vão desde a respiração até a fotossíntese, além de ser fundamental para a transferência de elétrons por meio de reações redox reversíveis, ciclando entre Fe^{2+} e Fe^{3+} (Kim et al., 2007). Entretanto, quando absorvido em altas concentrações, o Fe pode tornar-se um elemento altamente tóxico, alterando o metabolismo vegetal devido à sua propensão em gerar radicais livres nocivos pela reação de Fenton (Hänsch e Mendel, 2009; Ravet et al., 2009; Krohling et al., 2016). Estudos sugerem que concentrações elevadas de Fe suprimem a germinação de sementes e diminuem o alongamento das raízes em

plântulas (Liu et al., 2016a; Silva et al., 2023), provocam desordem nutricional (Jucoski et al., 2016; Silva et al., 2023) e diminuição no crescimento das plântulas, afetando a área, a matéria fresca e a seca (Silva et al., 2023).

A *Albizia lebbbeck* (L.) Benth é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae, que teve sua origem na Ásia e, posteriormente, foi introduzida em outras regiões, no Brasil é uma espécie considerada naturalizada. Estudos indicam o potencial de uso desta espécie em programas de recuperação de áreas contaminadas com metais traços (Perveen et al., 2012; Yousaf et al., 2019; Naveed et al., 2023). Entretanto, ainda não está claro quais mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares estão envolvidos no processo de resposta à toxicidade por Fe. Assim, estudos a fim de compreender os mecanismos relacionados às respostas morfológicas e bioquímicas durante a germinação da semente e no estabelecimento de plântulas de *A. lebbbeck* sob efeito de sulfato de ferro (II) são relevantes para avaliar como as plantas se adaptam às condições de elevado teor de Fe a fim de caracterizar espécies com potencial para uso na recuperação de áreas impactadas com altas concentrações de Fe.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espécie de estudo

A espécie *A. lebeck* é uma leguminosa perene, de tamanho médio, caducifólia, nativa da África tropical, Ásia e norte da Austrália (Arunachalam et al., 2023). Popularmente conhecida como albízia, destaca-se como uma espécie naturalizada, com ampla distribuição nos biomas brasileiros (Chagas e Dutra, 2020). A espécie possui um ciclo de vida com floração e frutificação precoce, a floração pode ocorrer em plantas com apenas 10 meses de idade, onde as vagens amadurecem no início da estação seca, permanecendo na árvore por 3 a 4 meses (Dransfield e Widjaja, 1995).

A. lebeck é uma espécie pioneira de grande importância na recuperação de áreas degradadas devido à sua capacidade de crescer rapidamente, fixar nitrogênio e melhorar a estrutura do solo (Singh et al., 2004; Mukhopadhyay e Masto, 2022). Suas aplicações em agroflorestas (Silue et al., 2024) e na recuperação de áreas degradadas destacam sua importância na restauração ecológica (Singh et al., 2004; Yousaf et al., 2019; Mukhopadhyay e Masto, 2022). Além disso, essa espécie é considerada uma opção promissora em programas de recuperação de áreas contaminadas por metais potencialmente tóxicos (Perveen et al., 2012; Yousaf et al., 2019; Naveed et al., 2023).

2.2. Influência dos metais traço na germinação de sementes e crescimento de plântulas

A germinação das sementes é uma das fases do ciclo reprodutivo da planta que pode interferir na distribuição e manutenção da diversidade genética de uma espécie, além de ser a etapa fundamental para a garantia do estabelecimento de mudas (Trindade et al., 2018). O processo de germinação inicia-se com a absorção de água pela embebição da semente seca e completa-se quando ocorre a protrusão da radícula (Bewley, 1997). A germinação pode ser dividida em três fases que correspondem: I) a absorção de água, II) ativação dos processos metabólicos, promovendo a expansão do hipocótilo e emergência da radícula e III) mobilização das reservas nutricionais para o crescimento da plântula (Bewley, 1997; Taiz et al., 2017).

O processo de germinação de sementes pode ser afetado negativamente pela presença de metais traço, provocando alterações morfológicas e bioquímicas, como alterações no metabolismo de proteínas envolvidas na germinação (Nanda e Agrawal, 2016; Ait Elallem et al., 2022).

Os metais traço são um grupo de elementos químicos metálicos que possuem densidades, pesos atômicos e números atômicos relativamente altos (Yan et al., 2020). A depender das suas funções nos sistemas biológicos, esses metais podem ser divididos em essenciais e não essenciais. Os metais traço essenciais como Cu, Fe, Mn, Ni e Zn, são indispensáveis para os processos fisiológicos e bioquímicos durante o desenvolvimento da planta (Yan et al., 2020). Os metais traço no solo são oriundos, principalmente, das ações antrópicas como a mineração e atividades agrícolas (Dutta et al., 2018; Davila et al., 2020; Wang et al., 2020; Yao et al., 2021).

Os metais traço são conhecidos por influenciar negativamente tanto a germinação das sementes quanto o desenvolvimento das mudas (Seneviratne et al., 2019; Ait Elallem et al., 2022). Ao ser absorvido pelas células vegetais, os metais traço exercem seus efeitos citotóxicos e genotóxicos devido ao rompimento das estruturas das proteínas (Dutta et al., 2018). Esses efeitos são eventualmente refletidos nos níveis fisiológico e bioquímico com diminuição da estabilidade da

membrana e rendimento fotossintético, resultando na produção comprometida de pigmentos, no desequilíbrio hormonal e de nutrientes, bem como na inibição da replicação do DNA, expressão gênica e divisão celular (Dutta et al., 2018; Kuinchtner et al., 2021).

Como organismos sésseis, as plantas desenvolveram mecanismos homeostáticos capazes de manter as concentrações corretas de íons metálicos essenciais em diferentes compartimentos celulares e/ou para minimizar os danos da exposição a íons metálicos fitotóxicos (Clemens, 2019). Há uma rede regulamentada de atividades de transporte, quelação, tráfico e sequestro de metais que atuam com o objetivo de fornecer a absorção, distribuição e detoxificação de íons metálicos (Clemens, 2001; Krohling et al., 2016). Além disso, os sintomas de toxicidade expressos nas plantas arbóreas indicam que seus mecanismos envolvidos na tolerância a metais traço podem permitir que elas suportem concentrações mais altas desses metais comparadas às culturas agrícolas (Meyer et al., 2016).

Plantas de *Cedrela fissilis* Vell. submetidas ao tratamento com cádmio (Cd) e alumínio apresentaram redução do crescimento da parte aérea e das raízes em altas concentrações (50 e 100 μM) destes elementos, sendo estas alterações morfológicas os principais sintomas da toxicidade destes metais nas plantas. Além disso, estas concentrações afetaram a taxa líquida de assimilação de CO_2 , a condutância estomática e a taxa de transpiração (Kuinchtner et al., 2021). Entretanto, estudos com elevadas concentrações de Fe ainda não foram realizados em *A. lebeck*.

2.3. Efeito do Fe no crescimento de plantas

O Fe é um metal essencial em vários processos fisiológicos, como a biossíntese de DNA e hormônios vegetais, no metabolismo do nitrogênio, respiração celular e fotossíntese (Hänsch e Mendel, 2009). O Fe é considerado um elemento abundante, representando, aproximadamente, 5% da crosta terrestre, entretanto, sua biodisponibilidade é muitas vezes um fator limitante para o desenvolvimento vegetal. Por outro lado, quando altas concentrações de Fe se

tornam disponíveis, este elemento passa a ser considerado fitotóxico (Krohling et al., 2016).

Plantas superiores desenvolveram pelo menos duas estratégias de absorção para adquirir Fe pouco biodisponível no solo. Na estratégia I, plantas não gramíneas bombeiam prótons para o ambiente extrarradicular (rizosfera) pela ativação das próton-adenosinatrifosfatases (P-ATPases) da membrana plasmática, provocando a acidificação e a redução de Fe^{3+} ao íon mais solúvel Fe^{2+} , seguido do transporte do íon Fe^{2+} através da membrana celular da raiz pelos Transportadores Regulados pelo Ferro (IRT1). Na estratégia II, plantas gramíneas usam um mecanismo baseado na secreção de ácidos mugineicos (MA) seguido da quelação do íon de suas raízes para quelar Fe (III) no solo (Krohling et al., 2016; Kobayashi et al., 2019). O Fe (III)–MAs são captados e absorvidos pelos sistemas de transporte Yellow Stripe 1 (YS1) e Yellow Stripe-Like (YSL) (Kobayashi et al., 2019).

A concentração de Fe na maioria das plantas varia de 100 a 300 mg kg⁻¹ de matéria seca (MS). Embora não haja valores de referência na legislação brasileira, concentrações superiores a 500 mg kg⁻¹ de MS superam o nível crítico de toxicidade (Pinto et al., 2016). Embora o Fe seja um nutriente essencial, quando há presença de altas concentrações deste elemento na célula, o Fe bivalente possui capacidade de catalisar via reação de Fenton, que produz uma grande quantidade de radicais livres de oxigênio, causando estresse oxidativo nas plantas (Wang et al., 2020).

O Fe é um elemento crucial para a fotossíntese, e mais de 80% do Fe nas células do mesofilo está concentrado nos cloroplastos (Hänsch e Mendel, 2009). A capacidade fotossintética nas plantas é regulada principalmente por reações fotoquímicas, que permitem a produção de energia, trocas gasosas, bem como fixação e assimilação de CO₂ (Kuinchtner et al., 2021). O aparato fotossintético das plantas é muito rico em átomos de Fe (21 ou 22 átomos), contendo dois ou três átomos de Fe por fotossistema II (PSII), 12 átomos de Fe por fotossistema I (PSI), cinco átomos de Fe por complexo de citocromo *b6f* (cyt *b6-f*) e dois átomos de Fe por molécula de ferredoxina (Varotto et al., 2002; Krohling et al., 2016).

Todavia, as mesmas propriedades redox que tornam o Fe adequado para a cadeia de transferência de elétrons na fotossíntese também são responsáveis por seus efeitos tóxicos quando está presente em excesso devido à superprodução de

espécies reativas de oxigênio (ERO) (Pinto et al., 2016). ERO são subprodutos de processos metabólicos, onde seus níveis são controlados pelo sistema antioxidante, e são produzidas em respostas a estresses, onde seus níveis elevados podem desencadear processos irreversíveis, como a morte celular (Berni et al., 2019).

O Fe pode também causar danos aos ácidos nucleicos por meio de ligação direta e clivagem ou indiretamente por estresse oxidativo e geração de ERO (Dutta et al., 2018). Uma ampla gama de diferentes condições ambientais extremas pode induzir a geração excessiva de EROs, com destaque para exposições a altas concentrações de metais de transição, como Fe, que promovem a produção de compostos mais reativos, como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radicais ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (HO^{\bullet}), sendo estes as principais espécies prejudiciais produzidas sob excesso de Fe pela reação de Fenton (Pinto et al., 2016).

Em um estudo conduzido com diferentes cultivares de *Oryza sativa* L. expostas a uma alta concentração de Fe^{2+} (7 mM), observou-se uma diminuição na biomassa fresca tanto da parte aérea quanto das raízes. Além disso, houve um aumento na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, sugerindo a ocorrência de danos oxidativos, adicionalmente, o ferro afetou negativamente a taxa fotossintética líquida (Pinto et al., 2016).

Em plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. submetidas ao tratamento com Fe^{2+} , constatou-se que a zona de alongamento da raiz foi reduzida em 68% em resposta ao tratamento com excesso de Fe (350 μM) em comparação com o controle, indicando uma capacidade reduzida de expansão celular na zona de alongamento e divisão celular da raiz (Li et al., 2015).

Como mecanismo para reduzir o efeito provocado pelo excesso de Fe, as plantas dependem de sua capacidade de armazenamento e remobilização desse elemento, a fim de manter a homeostase desse metal, uma vez que o excesso de Fe induz a formação de placas de Fe em raízes, as quais alteram a absorção de nutrientes (Casierra-Posada et al., 2017). Há evidências de que a formação de placas de Fe nas raízes do *O. sativa* fornece uma barreira física para o influxo de Fe reduzido, ou seja, serve como um mecanismo de exclusão (Li et al., 2015).

O efeito tóxico do Fe já é relatado para diversas plantas, com destaque para *A. thaliana* (Varotto et al., 2002; Ravet et al., 2009; Li et al., 2015) e *O. sativa* (Pinto et al., 2016; Tadaiesky et al., 2021; Zhang et al., 2022). Embora haja alguns estudos acerca do estabelecimento de mudas de espécies arbóreas como *C. fissilis*, *Morus alba* L. e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan em áreas contaminadas com metais traço (Guo et al., 2021; Kuinchtner et al., 2021; Santos et al., 2022), são poucos os estudos que correlacionem o efeito tóxico do Fe na germinação de sementes e crescimento de plântulas de arbóreas (Silva et al., 2023), tornando fundamental pesquisas mais aprofundadas acerca dos mecanismos de respostas durante a germinação e crescimento de plântulas de *A. lebbbeck* ao estresse induzido por diferentes concentrações de sulfato de ferro (II).

2.4. Análise do perfil proteômico vegetal em resposta ao estresse por Fe²⁺

A proteômica envolve o estudo em larga escala das proteínas, sua estrutura e seu papel ou funções fisiológicas (Shah e Misra, 2011). É o estudo sistemático da expressão de proteínas (Kerry et al., 2018). A proteômica representa o estado funcional de um organismo, tecido, organela ou célula em qualquer ponto do tempo e em determinada condição (Barnabas et al., 2015). Além de ser a ferramenta molecular dominante para descrever proteomas completos no nível de organela, célula ou tecido, a proteômica também pode ser utilizada para comparar proteínas sob diferentes fatores ambientais estressantes, como aqueles provocados por metais (Kerry et al., 2018).

Os estudos de proteômica podem contribuir substancialmente para revelar os aspectos da função celular nas respostas das plantas ao estresse, desvendando possíveis relações entre a abundância de proteínas e a tolerância da planta ao estresse (Hu et al., 2015). As plantas respondem aos estresses por meio de uma ampla gama de reações, desde mudanças morfológicas até alterações nos padrões de expressão de proteínas (Nouri e Komatsu, 2013). Assim, a análise proteômica de uma planta em condições fisiológicas diferentes pode indicar as alterações no proteoma e permite desvendar os mecanismos celulares e moleculares que regem sua capacidade de resposta à situação de estresse (Barnabas et al., 2015).

Para enfrentar o estresse induzido por metais traço, as plantas produzem um conjunto de estratégias tanto em nível proteômico quanto genômico, ativando uma resposta multigênica que resulta em alterações em várias proteínas, e conseqüentemente, afeta diretamente vários processos biológicos em uma célula viva (Kerry et al., 2018).

Em plantas de *O. sativa* o estresse provocado pela deficiência e pelo excesso de Fe^{2+} levaram a perturbações no conteúdo de proteínas em vias associadas ao metabolismo do carbono, biossíntese de aminoácidos e sistema antioxidante, e na superprodução de EROs que podem causar danos às plantas (Zhang et al., 2022). Embora existam estudos na literatura que descrevam o perfil proteômico durante a germinação e crescimento de plântulas sob estresse por Fe, não há ainda dados disponíveis relacionados ao perfil proteômico de *A. lebeck* submetida a esse tipo de estresse. Assim, torna-se pertinente a realização de pesquisas dedicadas à compreensão da regulação de proteínas associadas à germinação e ao crescimento de plântulas de *A. lebeck* em ambientes com elevadas concentrações de Fe^{2+} .

2.5. Conteúdo endógeno de hormônios vegetais em resposta ao estresse por metais traço

Os hormônios desempenham um papel importante na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (Zwanenburg e Blanco-Ania, 2018). Os cinco grupos de hormônios vegetais com grande destaque são auxinas, citocininas, giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) e etileno (Taiz et al., 2017; Zwanenburg e Blanco-Ania, 2018). Entretanto, há outros hormônios relevantes para o crescimento e desenvolvimento de plantas, como os brassinosteroides, ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e estrigolactonas (Yuan e Lin, 2008; Taiz et al., 2017; Han et al., 2022).

A GA é um hormônio vegetal que atua induzindo a germinação das sementes (Wang et al., 2020). Em contraponto, o ABA reduz o efeito germinativo induzindo a dormência das sementes (Seneviratne et al., 2019). Estudos mostram que metais traço afetam os níveis de hormônios durante a germinação de sementes (Seneviratne et al., 2019). Dados evidenciam que o tratamento de sementes de *O. sativa* com chumbo (Pb) provocou um atraso na germinação das sementes, induziu

menor biossíntese de GAs bioativas, inibiu a transdução de sinal induzido pelas GAs e, por outro lado, promoveu o aumento da síntese de ABA na semente (Wang et al., 2020).

Além da relevância do ABA na indução da dormência nas sementes (Wang et al., 2020), este também atua na reprogramação da expressão gênica, proteção da fotossíntese, fechamento estomático, maturação das sementes e crescimento primário da raiz (Bittner et al., 2022). Estudos com sementes de *Oryza glaberrima* Steud. mostraram uma interação entre ABA e o tratamento com Fe, onde o ABA exógeno diminuiu os níveis de mRNA da ferritina nas bainhas das plantas tratadas com Fe (Majerus et al., 2009). Em sementes de *O. sativa* o conteúdo de ABA no tratamento com Pb aumentou em comparação com o tratamento controle, sugerindo que o tratamento com Pb provoca diminuição da taxa de germinação de sementes por meio de um mecanismo mediado por um conteúdo reduzido de GAs bioativas e aumento no conteúdo de ABA (Wang et al., 2020).

As auxinas desempenham um papel crucial na coordenação do crescimento nas plantas, atuando no controle da formação de órgãos vegetais, como embrião, raiz, folhas e flores (Wu et al., 2020). O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina que ocorre naturalmente nas plantas (Wu et al., 2020). Em plantas de *Arachis hypogaea* L. cultivadas sob déficit de Fe, a auxina funciona a jusante do etileno para induzir a regulação positiva do gene relacionado à absorção de Fe e da atividade enzimática, incluindo IRT1 e H⁺-ATPase (Du et al., 2022). Dados revelam que quando confrontadas com metais traço em excesso, as plantas podem regular a transcrição de genes relacionados a auxinas para ajustar a localização e o acúmulo efetivo de auxinas dentro da planta para melhor adaptação e sobrevivência sob o ambiente adverso (Wang et al., 2015).

O etileno desempenha um papel regulador central em todo o ciclo de vida da planta, desde a germinação até a integração das mudanças ambientais no amadurecimento dos frutos (Bittner et al., 2022). No crescimento de raízes de *A. thaliana*, o excesso de Fe²⁺ promoveu um aumento significativo nos níveis de etileno nas raízes, além disso, o etileno induzido pelo Fe contribuiu para a tolerância primária ao crescimento da raiz. Logo, o excesso de Fe tem potencial para inibir o crescimento da raiz, reduzindo o alongamento e a divisão celular, todavia, esse papel inibitório é parcialmente atenuado pela síntese de etileno (Li et al., 2015). O

etileno reduz o acúmulo de Fe na raiz, por meio do aumento da expressão de genes que codificam a ferritina, uma sequestradora de Fe, e desta forma minimiza as concentrações de Fe^{2+} nos tecidos (Majerus et al., 2007; Li et al., 2015).

O SA é um hormônio que está envolvido em muitos processos metabólicos e fisiológicos importantes nas plantas, incluindo floração, fechamento estomático, termogênese, metabolismo de osmólitos, fotossíntese, balanço hídrico e sistemas de defesa antioxidante (Emamverdian et al., 2020). Entretanto, um dos papéis importantes do SA é sua ação como uma molécula sinalizadora em respostas de defesa contra uma variedade de estresses ambientais (Jayakannan et al., 2015). O tratamento de imersão de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. em SA ou em combinação alternada com cinetina e cálcio confere tolerância contra efeitos prejudiciais de Ni e Pb através de sistemas antioxidantes aprimorados, acúmulo de prolina e redução de ERO, bem como a estabilidade da membrana (Khalil et al., 2021).

O JA é essencial na regulação de múltiplos processos vegetais para adaptação ambiental (Han et al., 2022), a sua sinalização medeia as defesas das plantas contra herbívoros e patógenos, ao mesmo tempo em que confere tolerância ao estresse abiótico. Além disso, o JA é necessário para a reprodução, crescimento e processos de desenvolvimento da planta (Pan et al., 2022). Em *O. sativa* sob estresse por Cd, o JA promoveu o crescimento da planta sob estresse, além de aliviar a toxicidade do Cd na planta ativando o sistema de defesa antioxidante (Li et al., 2022).

Os hormônios vegetais são cruciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, e sua regulação é influenciada por uma série de fatores, incluindo a presença de metais traço, reforçando a necessidade de estudos para compreender os mecanismos envolvidos no processo de resposta das plantas ao estresse por metais traço.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência de diferentes concentrações de sulfato de ferro (II) na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *A. lebeck*, investigando as alterações no perfil proteômico, conteúdo endógeno de hormônios vegetais, pigmentos fotossintéticos e no teor de nutrientes.

3.2. Objetivos específicos

Investigar os efeitos das diferentes concentrações de sulfato de ferro (II) na germinação de sementes;

Analisar as mudanças no perfil proteômico durante o crescimento inicial das plântulas sob diferentes concentrações de sulfato de ferro (II);

Avaliar as alterações nos níveis endógenos de hormônios vegetais (AIA, ABA, GA, JA, SA e ACC) em resposta à presença de sulfato de ferro (II);

Analisar o impacto dos tratamentos com sulfato de ferro (II) na absorção e acúmulo de nutrientes nas plântulas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *A. lebbeck* foram adquiridas da empresa comercial Viveiro Caiçara (<https://sementescaicara.com>), localizada em Brejo Alegre, estado de São Paulo, Brasil (21°9'58"S e 50°10'55"W).

4.1. Efeito do sulfato de ferro na germinação e crescimento de plântulas

Para avaliar o efeito do sulfato de ferro (II) na germinação de sementes e no crescimento de plântulas, as sementes passaram por um processo de desinfestação por 20min em uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (Qboa®, Osasco, Brasil), suplementada com o fungicida (Derosal®, São Paulo, Brasil) na concentração de 200 μL^{-1} .

Posteriormente, em uma cabine de fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada, autoclavada previamente, e transferidas para placas de Petri esterilizadas contendo duas folhas de papel de germinação. Em cada placa de Petri, foram adicionados 15 mL de uma solução com diferentes concentrações de sulfato de ferro (II) (0, 2, 4, 8, 16, 24 e 32 mM). As concentrações de sulfato de ferro (II) foram previamente dissolvidas e filtradas usando filtros de membrana de PES de 0,22 μm (BioFil®; Guangzhou, China). O pH da solução foi ajustado para 5,5 adicionando HCl 1N e KOH 1N. Após um período de incubação de quatro dias, foram adicionados mais 5 mL da respectiva solução em cada placa

de Petri. As placas de Petri foram transferidas para uma câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16h e intensidade de luz de $55 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com sete concentrações de sulfato de ferro (II), cada uma consistindo em cinco repetições de 30 sementes cada, totalizando 210 sementes por tratamento. Após 12 dias, a matéria fresca (MF) e a matéria seca (MS) das partes radiculares e aéreas foram avaliadas. Além disso, foram coletadas amostras para análise proteômica, pigmentos fotossintéticos, análise hormonal e nutrientes.

4.2. Análise de dados proteômicos

Análises proteômicas comparativas foram realizadas utilizando amostras (300 mg de MF cada, em triplicata) de plântulas em concentrações de 0, 4 e 24 mM de sulfato de ferro (II), comparando as plântulas dos tratamentos: a) 4 mM/0 mM; b) 24 mM/0 mM e c) 24 mM/4 mM.

As proteínas foram extraídas utilizando o método de ácido tricloroacético (TCA)/acetona com modificações (Damerval et al., 1986). Inicialmente, as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram ressuspendidas em 1 mL de tampão de extração de proteínas contendo 10% (p/v) de TCA (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) em acetona (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) com 20 mM de ditioneitol (DTT; GE Healthcare; Piscataway, EUA) e vortexadas por 30min.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $16.000 \times g$ por 20min a 4°C . Os pellets resultantes foram lavados três vezes com acetona e DTT 20 mM e centrifugados por 5min cada vez a 4°C . Os pellets foram secos ao ar, ressuspendidos em tampão contendo 7 M de ureia (GE Healthcare), 2 M de tiourea (GE Healthcare; Piscataway, EUA), 2% de Triton X-100 (GE Healthcare), 1% de DTT (GE Healthcare; Piscataway, EUA) e 1 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF; Sigma-Aldrich), vortexados e incubados em gelo por 30min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 16.000 xg por 20min a 4°C . Os sobrenadantes contendo proteínas totais foram coletados, e a concentração de proteína foi medida usando o método de Bradford (Bradford, 1976).

Antes da etapa de digestão com tripsina, as amostras de proteínas foram precipitadas utilizando a metodologia de metanol/clorofórmio (Nanjo et al., 2012). Após a precipitação das proteínas, as amostras foram ressuspensas em uma solução de 7 M de ureia/2 M de tiourea. Alíquotas de 100 µg de proteína foram submetidas à digestão tripsina utilizando a metodologia de preparação de amostra com auxílio de filtro (FASP) (Reis et al., 2021). Em seguida, os peptídeos foram ressuspensos em uma solução de 100 µL contendo 95% de bicarbonato de amônio 50 mM, 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico e quantificados por uma metodologia de proteína e peptídeo em A205 nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As amostras foram transferidas para frascos de recuperação total (Total Recovery Vials, Waters; Manchester, Reino Unido) para análise por espectrometria de massa.

Para a análise por espectrometria de massa, foi utilizado um nanoAcquity UPLC conectado a um espectrômetro de massa Synapt G2-Si HDMS (Waters; Manchester, Reino Unido) para análise de cromatografia líquida por espectrometria de massa em tandem com eletrospray (nanoESI-LC-MS/MS). Um total de 2 µg de peptídeos foi carregado em uma coluna C18 (180 µm × 20 mm; Waters; Manchester, Reino Unido) a 5 µL min⁻¹ por 3min e, em seguida, em uma coluna analítica de fase reversa nano-Acquity HSS T3 1,8 µm (75 µm × 150 mm; Waters; Manchester, Reino Unido) a 400 nL min⁻¹, com temperatura da coluna de 45°C.

Foi utilizado um gradiente binário para eluição de peptídeos: a fase móvel A consistia em água (Tedia; Fairfield, EUA) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA), e a fase móvel B consistia em acetonitrila (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) e 0,1% de ácido fórmico. A eluição do gradiente foi realizada sequencialmente da seguinte forma: inicia-se com 5% de B, que foi então aumentado para 40% de B até 92min e de 40 a 99,9% de B até 96min, após o que foi mantido em 99,9% de B até 100min, posteriormente diminuído para 5% de B até 102min e mantido em 5% de B até o final da corrida aos 118min.

A espectrometria de massa foi realizada no modo positivo e de resolução (modo V), com largura total à meia altura de 35.000, com separação de mobilidade iônica (IMS) e no modo de aquisição de dados independente (DIA) (HDMSE). A IMS foi realizada utilizando um programa de velocidade de onda começando em 800 m s⁻¹ e terminando em 500 m s⁻¹, com um fluxo de gás hélio e IMS de 180 e 90 mL

min⁻¹, respectivamente. A energia de colisão de transferência variou de 25 a 55 V no modo de alta energia, com voltagens de cone e capilar de 30 e 2800 V, respectivamente, e uma temperatura de fonte de 80°C.

Em relação aos parâmetros de tempo de voo (TOF), o tempo de varredura foi ajustado para 0,5s no modo contínuo com uma faixa de massa de 50 a 2000 Da. O [Glu¹]-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) a 100 fmol μL⁻¹ foi utilizado como padrão externo, e a aquisição de massa de bloqueio foi realizada a cada 30s. A aquisição espectral de massa foi realizada por 90min utilizando o software MassLynx versão 4.1.

O processamento de espectros e as condições de busca em banco de dados foram realizados utilizando o software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0.2 (Waters; Manchester, Reino Unido). O PLGS foi processado pelos seguintes parâmetros: as configurações de processamento de dados brutos incluíram um limiar de energia baixa de 150 (contagens), um limiar de energia alta de 50 e um limiar de intensidade de 750. Além disso, a análise foi realizada com os seguintes parâmetros: duas quebras de clivagem perdidas; número mínimo de íons de fragmento por peptídeo igual a três; número mínimo de íons de fragmento por proteína igual a sete; número mínimo de peptídeos por proteína igual a dois; modificações fixas de carbamidometil (C) e modificações variáveis de oxidação (M) e fosforilação (STY); e a taxa de descoberta falsa (FDR) padrão foi definida como um máximo de 1%. O banco de dados de proteínas de *Arachis hypogaea* L. do UniProtKB (<http://www.uniprot.org>), com ID de proteoma: UP000289738, foi usado para identificação de proteínas, pois é o maior banco de dados com proximidade com *A. lebeck*.

As análises de quantificação sem rótulo foram realizadas usando o software ISOQuant workflow, versão 1.7 (Distler et al., 2013). Resumidamente, os seguintes parâmetros foram usados para identificar proteínas: FDR 1%, uma pontuação de peptídeo maior que seis, um comprimento mínimo de peptídeo de seis aminoácidos, e pelo menos dois peptídeos por proteína foram considerados para quantificação sem rótulo usando a abordagem TOP3, seguida pelo processo multidimensional normalizado dentro do ISOQuant.

Para garantir a qualidade dos resultados após o processamento dos dados, apenas as proteínas que estavam presentes ou ausentes (para proteínas únicas)

em todas as três replicatas biológicas foram consideradas para análise de proteínas de acumulação diferencial (DAP). Os dados foram analisados usando o teste t de Student (bilateral). Proteínas com ANOVA ($P < 0,05$) foram consideradas acumuladas positivamente se o valor \log_2 *fold change* (FC) fosse maior que 0,60 e acumuladas negativamente se o valor \log_2 do FC fosse menor que -0,60. As anotações funcionais foram realizadas usando o software OmicsBox versão 3.0 (<https://www.biobam.com>) e UniProtKB (<http://www.uniprot.org>, acessado em 5 de fevereiro de 2024). As redes de interação preditas de DAPs foram construídas, com confiança $> 0,9$, usando homólogos de *A. hypogaea* identificados por meio de uma pesquisa STRING (<https://string-db.org>, acessado em 5 de fevereiro de 2024) seguida por análise subsequente no Cytoscape (versão 3.9) (Szklarczyk et al., 2021).

4.3. Análise de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos clorofila (*Chl*) *a*, *b* e carotenoides foram analisados de acordo com Arnon (1949). Amostras (200 mg de MF, em triplicata) da parte aérea de plântulas após 12 dias de incubação foram utilizadas. Estas amostras foram extraídas em tubos de ensaio contendo 10 mL de acetona a 80%.

Posteriormente, as amostras foram incubadas no escuro a 3°C por 24h. Leituras de absorvância foram realizadas pelo leitor de microplacas Versamax (Molecular Devices, USA) em comprimentos de onda de 663 nm para Chl *a*, 645 nm para Chl *b* e 470 nm para carotenoides, utilizando o SoftMax Pro® 6.0. O teor de pigmentos foi calculado utilizando as seguintes equações (Arnon, 1949):

$$\text{Chl } a = ((12,7 \times \text{DO}_{663} - 2,69 \times \text{DO}_{645}) V) / 1000 \times W;$$

$$\text{Chl } b = ((22,9 \times \text{DO}_{645} - 4,68 \times \text{DO}_{663}) V) / 1000 \times W;$$

$$\text{Carotenoides} = ((1000 \times \text{DO}_{470} - 3,27 \times \text{Chl } a - 104 \times \text{Chl } b) / 229) / 1000 \times W.$$

Onde DO representa a densidade óptica, V representa o volume total do extrato (mL) e W denota a matéria fresca (g) da amostra vegetal utilizada.

4.4. Análise de hormônios vegetais

Os hormônios vegetais AIA, ABA, GA, SA, JA e ACC foram extraídos de acordo com Silveira et al. (2004), com modificações. Amostras (150 mg de MF, em quintuplicata) de plântulas de 12 dias foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e maceradas até formar um pó fino. Em seguida, foram adicionados 1,5 mL de tampão de extração composto por 80% de etanol (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) e 1% de polivinilpirrolidona (PVP-40) (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA). Posteriormente, as amostras foram sonicadas por 10min centrifugadas a 16.000 x g a 4°C por 10min. O sobrenadante foi seco em um concentrador a vácuo a 45°C. O volume da amostra foi então ajustado para 500 µL/500 mg com água Milli-Q, e o pH foi ajustado para 2,5 a 3,2 com 40 µL de ácido acético (Synth, São Paulo, Brasil).

Para cada amostra, foram adicionados duas vezes 1 mL de éter etílico (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) e incubados em gelo por 2min, coletando a fase orgânica em um novo microtubo e colocando-o em um concentrador a vácuo a 45°C até que as amostras estivessem completamente secas. As amostras foram ressuspensas em 500 µL de metanol:água (10:90), filtradas usando uma seringa com um filtro PTFE de 0,22 µm (Merck Millipore; Darmstadt, Alemanha) e armazenadas em frascos (Waters; Manchester, Reino Unido).

Os hormônios foram separados por cromatografia líquida usando 10 µL da solução recuperada da extração em uma coluna BEH C18 1,7 µm (2,1 µm × 50 mm; Waters; Manchester, Reino Unido) aquecida a 40°C, com uma taxa de fluxo de 300 µL min⁻¹. O gradiente binário consistiu em água grau LC-MS com 0,01% de ácido fórmico e metanol grau LC-MS com 0,01% de ácido fórmico como eluente. O gradiente de eluição começou com 10% de metanol e foi mantido por 2min, aumentando linearmente para 90% ao longo de 4min, em seguida, aumentando linearmente para 100% em um minuto, e diminuindo para 10% em 50s, mantido em 10% por 70s, totalizando um tempo de execução de 9min.

Utilizando uma fonte de ionização com eletropulverização (ESI) de alta performance em Z-spray ortogonal duplo (Waters; Manchester, Reino Unido), os efluentes do Acquity UPLC I-Class FTN (Waters; Manchester, Reino Unido) foram introduzidos no espectrômetro de massas triplo quadrupolo Xevo TQ-XS (Waters;

Manchester, Reino Unido). Foi empregada nebulização pressurizada de gás nitrogênio a 7 Bar, com fluxo de dessolvatação de 1000 L h⁻¹ e fluxo no cone de 150 L h⁻¹. A temperatura do gás de dessolvatação foi 650°C, a temperatura da fonte 150°C, e a tensão capilar para 3 kV. Para a operação do duplo quadrupolo em tandem (MS/MS), foi utilizado gás argônio como gás de colisão a uma pressão de 0,8 kgf/cm² na célula de colisão. O espectrômetro operou no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), com tensão do cone, energia de colisão, massa precursora e massa de fragmento dependendo do hormônio em estudo. O software Masslynx versão 4.2 (Waters; Manchester, Reino Unido) foi utilizado para processar os cromatogramas.

Após a aquisição, os espectros foram integrados, e os hormônios foram quantificados utilizando o software TargetLynx XS (Waters; Manchester, Reino Unido). A área sob o pico de cada hormônio foi comparada com uma curva padrão (AIA, ABA, GA, JA, SA, ACC) em pg. As médias das cinco réplicas biológicas de cada tratamento foram comparadas usando um teste T para inferir diferenças significativas entre as médias ao nível de 5% de probabilidade.

4.5. Determinação do conteúdo de nutrientes

As amostras da parte aérea e das raízes foram secas em estufa de circulação de ar por 24h a 65°C. A MS foi então moída e utilizada para a determinação do teor de nutrientes. Para determinar os teores de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, Cu e B, amostras (100 mg de MS cada, em triplicata) da parte aérea e das raízes foram utilizadas. Em seguida, a digestão foi realizada com HNO₃ concentrado e H₂O₂ em um sistema de digestão aberto (Peters, 2005). Os elementos foram quantificados ao mesmo tempo por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado usando um aparelho ICPE-9000 (Shimadzu® Scientific Instruments, Columbia, EUA) utilizando as seguintes condições: gás de plasma 8,0 L min⁻¹, gás auxiliar 0,70 L min⁻¹ e gás transportador 0,55 L min⁻¹.

Para avaliar o teor de N, amostras (100 mg de MS cada, em triplicata) da parte aérea e da raiz foram utilizadas. O teor de N foi determinado após digestão sulfúrica pelo método de Nessler (Jackson, 1965).

4.6. Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($P < 0,05$) e ao teste de separação de médias de Tukey com probabilidade de 5%, realizado utilizando o software R, versão 3.4.4.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) na germinação de sementes e no crescimento de plântulas.

A protrusão da radícula começou no segundo dia após a imersão das sementes em diferentes concentrações de sulfato de ferro (II) (Figura 1). Conforme a concentração de sulfato de ferro (II) aumentou, observou-se uma redução na porcentagem de germinação, sendo significativamente menor em concentrações mais altas (16, 24 e 32 mM) de sulfato de ferro (II) (Figuras 1a, 1d e 1e). O comprimento das raízes também foi significativamente afetado nas concentrações de 16, 24 e 32 mM de sulfato de ferro (II) (Figura 1b) e o comprimento da parte aérea foi significativamente afetado a partir de 8 mM (Figura 1c).

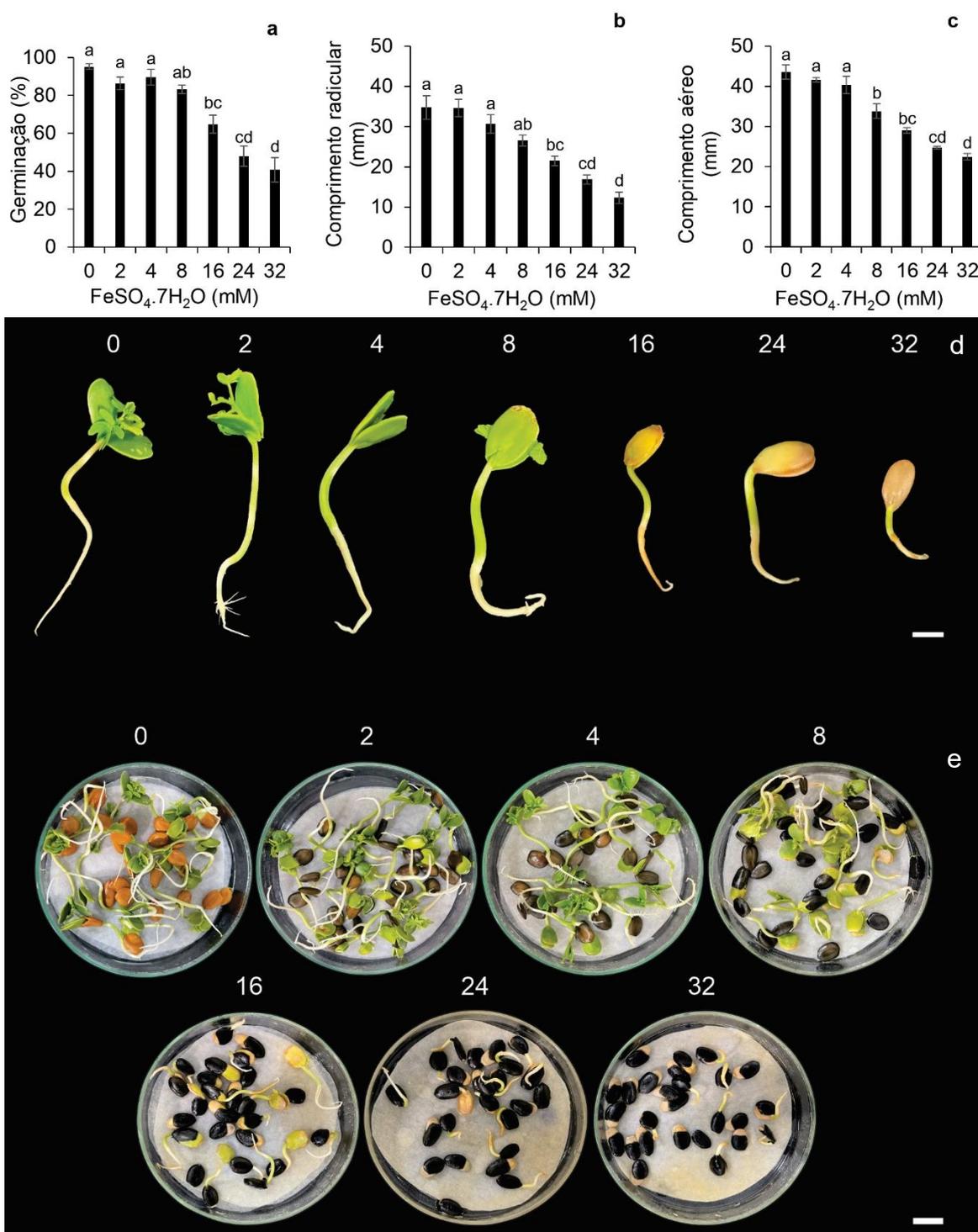


Figura 1. Porcentagem de germinação (a), comprimento da raiz (b) e comprimento da parte aérea (c), bem como aspectos morfológicos de plântulas de *Albizia lebeck* (d, e) sob diferentes concentrações (mM) de sulfato de ferro (II) após 12 dias de incubação. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra 1d = 1 cm; Barra 1e = 2 cm.

As concentrações de sulfato de ferro (II) promoveram uma diminuição no crescimento das plântulas. O sulfato de ferro (II) resultou em uma redução

significativa na matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) da parte aérea das plântulas em 24 e 32 mM (Figuras 2c e 2d). Além disso, observou-se uma redução significativa tanto na MF quanto na MS das raízes em plântulas incubadas com concentrações mais elevadas (16, 24 e 32 mM) de sulfato de ferro (II) (Figuras 2a e 2b).

O índice de tolerância das raízes diminuiu à medida que as concentrações de sulfato de ferro (II) aumentaram, apresentando valores abaixo de 50% em 24 e 32 mM (Figura 2d). Da mesma forma, o índice de tolerância da parte aérea diminuiu à medida que as concentrações de sulfato de ferro (II) aumentaram; no entanto, todos os tratamentos mantiveram valores acima de 50% (Figura 2d). Além disso, o índice de fitotoxicidade das raízes apresentou valores superiores a 50% nos tratamentos com concentrações de 24 e 32 mM de sulfato de ferro (II) (Figura 2e). No entanto, na parte aérea, esses valores não ultrapassaram 50% de fitotoxicidade, mesmo em concentrações mais elevadas de sulfato de ferro (II) (Figura 2e).

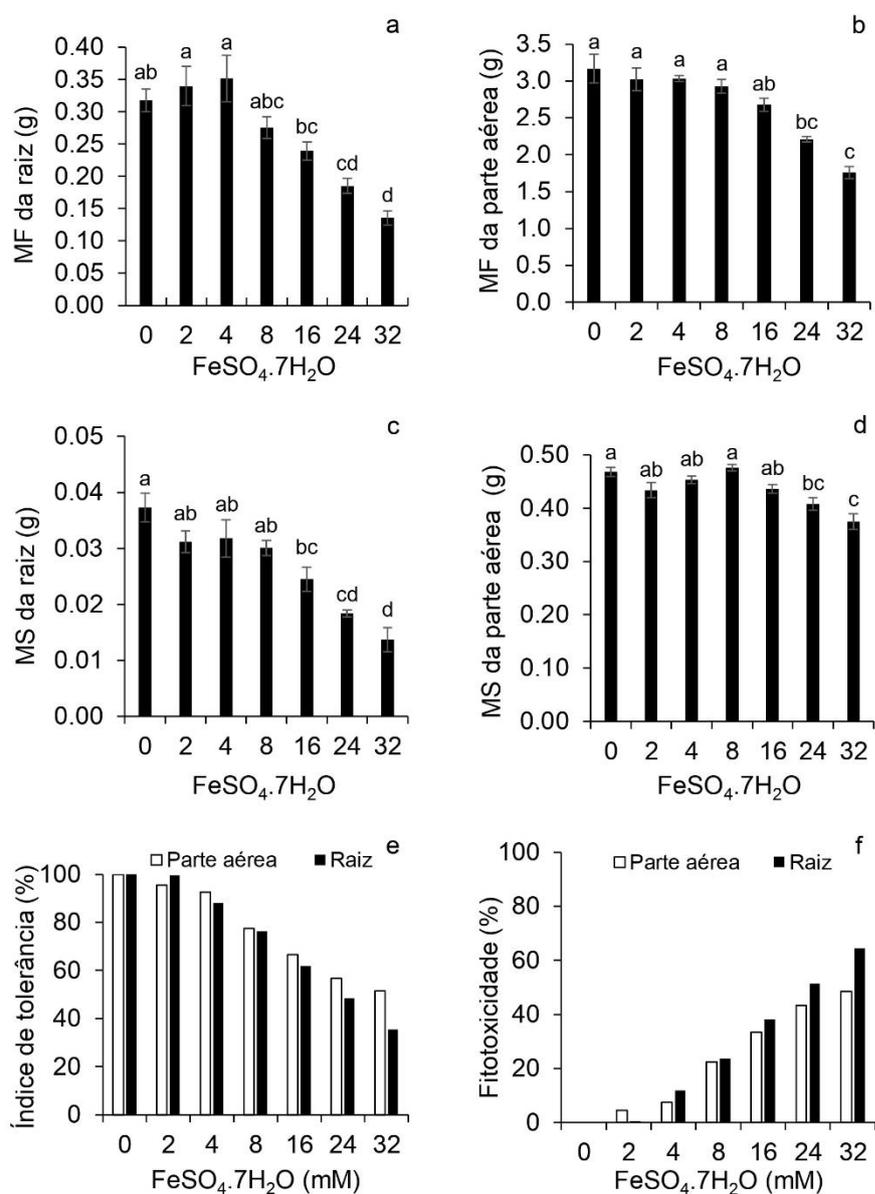


Figura 2. Matéria fresca das raízes (a) e parte aérea (b), matéria seca das raízes (c) e parte aérea (d), índice de tolerância (e) e fitotoxicidade (f) em plântulas de *A. lebeck* após 12 dias de incubação. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,05$).

5.2. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) no perfil proteômico.

Análise proteômica foi conduzida utilizando plântulas de 12 dias em três diferentes concentrações de sulfato de ferro (II): 0 mM, 4 mM e 24 mM. Essas concentrações foram selecionadas com base nos resultados obtidos em relação ao percentual de germinação, crescimento das plântulas, bem como matéria fresca e seca, onde a concentração de 0 mM serviu como controle, enquanto 4 mM não mostrou efeito significativo, e 24 mM apresentou efeitos significativos sobre esses

parâmetros. Comparativos foram feitos entre plântulas cultivadas em 4 mM e 0 mM (4/0 mM), 24 mM e 0 mM (24/0 mM), e 24 mM e 4 mM (24/4 mM).

Através da análise proteômica realizada em plântulas tratadas com sulfato de ferro (II), foi possível identificar um total de 363 proteínas na comparação de 4/0 mM, onde três proteínas *up*-acumuladas foram identificadas, uma proteína foi única na concentração de 4 mM, uma única na concentração de 0 mM, e 358 proteínas *unchanged* (inalteradas) (Figuras 3a e 3d). Na comparação de 24/0 mM, um total de 352 proteínas foram identificadas, das quais 25 foram proteínas foram *up*-acumuladas, 169 proteínas *down*-acumuladas, 3 únicas para 24 mM e 17 únicas para 0 mM, além de 138 proteínas *unchanged* (Figuras 3b e 3e). Ao comparar as concentrações de 24/4 mM, um total de 352 proteínas foi identificado, com 23 proteínas *up* e 154 *down*-acumuladas, 3 proteínas únicas para 24 mM, e 16 proteínas únicas para 4 mM, além de 156 proteínas *unchanged* (Figuras 3c e 3f).

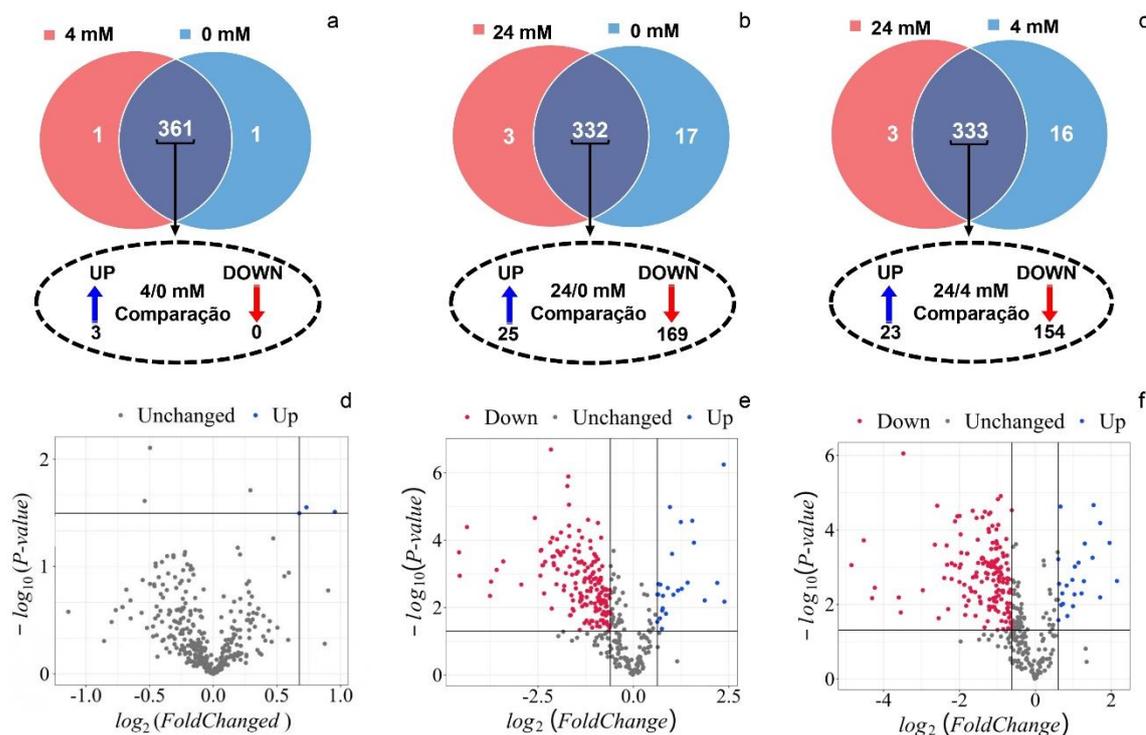


Figura 3. Diagrama de Venn (a, b, c) e Volcano Plot (d, e, f) mostrando as proteínas totais identificadas e proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) em plântulas de *A. leibbeckii* após 12 dias de incubação, comparando as concentrações de 4/0 mM (a, d), 24/0 mM (b, e) e 24/4 mM (c, f) de sulfato de ferro (II). Proteínas com resultados significantes no teste t de Student (bilateral; $P < 0,05$) foram consideradas DAPs, sendo consideradas com aumento no acúmulo se a mudança \log_2 (FC) fosse maior que 0,6 e com redução no acúmulo se a mudança \log_2 (FC) fosse menor que -0,6.

Na comparação 4/0 mM, o perfil proteômico das plântulas foi semelhante, indicando a ausência de efeitos fitotóxicos induzidos pelo sulfato de ferro (II) na concentração de 4 mM. No entanto, análises adicionais foram conduzidas, incluindo uma rede de interação proteína-proteína e uma análise de enriquecimento da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Figura 4).

Todas as proteínas identificadas na rede de interação proteína-proteína permaneceram *unchanged* nessa comparação específica. No entanto, foi observada uma diminuição significativa no acúmulo dessas mesmas proteínas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM. A análise de enriquecimento KEGG revelou a formação de *clusters* de proteínas interagindo entre si, participando de várias vias metabólicas como fixação de carbono em organismos fotossintéticos, biossíntese de metabólitos secundários, fotossíntese, ciclo do citrato (ciclo de Krebs), proteassoma, fotossíntese - proteínas de antena e fosforilação oxidativa.

Entre as proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs), algumas se destacaram por seu envolvimento no processo de resposta ao estresse oxidativo, como a glutathione peroxidase (A0A445DTP6), a glutathione S-transferase (A0A444Y2J0) e a catalase (A0A445CCX1, A0A445BRP0). As proteínas glutathione peroxidase (A0A445DTP6) e glutathione S-transferase (A0A444Y2J0) foram *up*-acumuladas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM de sulfato de ferro (II). No entanto, a proteína catalase (A0A445CCX1, A0A445BRP0) foi *down*-acumulada nas mesmas comparações.

Para investigar a interação das DAPs, foi realizado uma rede de interação proteína-proteína para as comparações 24/0 mM (Figura 5) e 24/4 mM (Figura 6). A análise de enriquecimento da via KEGG revelou que as DAPs formam *clusters* de proteínas interagindo entre si, participando de diversas vias, como fixação de carbono em organismos fotossintéticos, biossíntese de metabólitos secundários, fotossíntese, ciclo do citrato (ciclo de Krebs), proteassoma, fotossíntese - proteínas antena, fosforilação oxidativa e ribossomo (Figuras 5 e 6).

Entre as interações proteína-proteína nas vias metabólicas, algumas foram destacadas e discutidas quanto às suas relações com os processos de crescimento e desenvolvimento das plântulas. Foi observado um maior efeito de 24 mM de sulfato de ferro (II) na redução do acúmulo de várias proteínas em comparação com os tratamentos de 0 mM e 4 mM. A proteína contendo o domínio ribossomal S7

(A0A445E5B5), a proteína ribossomal 60S ácida P0 (A0A445CX18) e a proteína ribossomal 60S L1 (A0A0A6ZDS7) foram *down*-acumuladas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM, enquanto a proteína contendo o domínio L7Ae ribossomal (A0A445CS98) foi *up*-acumulada e a proteína ribossomal 40S S6 (A0A444ZWP4) foi única em 0 mM e 4 mM nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM, respectivamente (Figuras 5 e 6, *cluster* roxo). Essas proteínas mostraram interação com a proteína fator de alongação Tu (A0A445CKV5, A0A445ATT0, A0A445AB33), que teve seu acúmulo reduzido em plântulas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM.

Associadas à biossíntese de metabólitos secundários, a proteína peroxissomal acil-coenzima A oxidase 4 (A0A445EAM5) interage com a proteína 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (A0A445DIP1, A0A445AWT5), ambas foram reduzidas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM (Figuras 5 e 6, *cluster* amarelo).

Além do mais, a proteína subunidade beta do proteassoma (A0A445DUK2, A0A445D0T6, A0A445CNU0, A0A445B427) interage com as proteínas subunidade regulatória não-ATPase 2 do proteassoma 26S homóloga (A0A445E060) e CCT-eta (A0A444YE95). Essas proteínas estão relacionadas ao proteassoma e foram *down*-acumuladas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM (Figuras 5 e 6, *cluster* azul).

Contudo, a proteína relacionada à fixação de carbono, biossíntese de metabólitos secundários e ciclo do citrato (ciclo de Krebs), como a malato desidrogenase (A0A445DRP9, A0A445BI82, A0A445BI73, A0A445AZS1, A0A445AD99, A0A445A3S6) (Fig. 5 e 6, *cluster* verde), interagiu com proteínas associadas à biossíntese de metabólitos secundários, como a malato sintase (A0A445ATH7) e a isocitrato liase (A0A445E0V5, A0A445D9V5), que foram *down*-acumuladas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM (Figuras 5 e 6, *cluster* verde).

Proteínas associadas à fixação de carbono em organismos fotossintéticos e à biossíntese de metabólitos secundários, como a cadeia pequena da ribulose bifosfato carboxilase (A0A444X9E3), interagem com as proteínas contendo o domínio terminal C da subunidade grande da ribulose bifosfato carboxilase (A0A445BJK2) e a proteína contendo o domínio grande da RuBisCO (A0A445EET8). Essas proteínas foram *down*-acumuladas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM (Figuras 5 e 6, *cluster* cinza).

A proteína contendo o domínio N-terminal da subunidade alfa/beta do complexo ATPase F1/V1/A1 (A0A445B598) mostrou interação com as proteínas contendo o domínio de ligação de nucleotídeos da subunidade alfa/beta do complexo ATPase F1/V1/A1 (A0A445AI22), ATPase de dois setores transportadores de H⁺ (A0A445BUJ9, A0A445DVJ9) e subunidade beta da ATP sintase (A0A444XW77), que foram *down*-acumuladas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM. Além disso, a análise de enriquecimento KEGG mostrou que essas proteínas estão relacionadas à fosforilação oxidativa (Figuras 5 e 6, *cluster* vermelho).

Entre as proteínas relacionadas à fotossíntese (Figuras 5 e 6, *cluster* rosa), o sistema de fotossíntese I (A0A445BUL7) e a proteína D1 do sistema de fotossíntese II (A0A445AGZ0, A0A445BSX1) foram únicas em 0 mM na comparação 24/0 mM e únicas em 4 mM na comparação 24/4 mM, enquanto a proteína intensificadora evolutiva de oxigênio 1 (A0A445ANU8) foi *down*-acumulada nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM. Essas proteínas interagem com a proteína de ligação de clorofila *a-b*, cloroplástica (A0A445D4N7, A0A445CYP2, A0A445C2K4) relacionada às proteínas antena da fotossíntese, que tiveram seu acúmulo reduzido nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM (Figuras 5 e 6, *cluster* rosa).

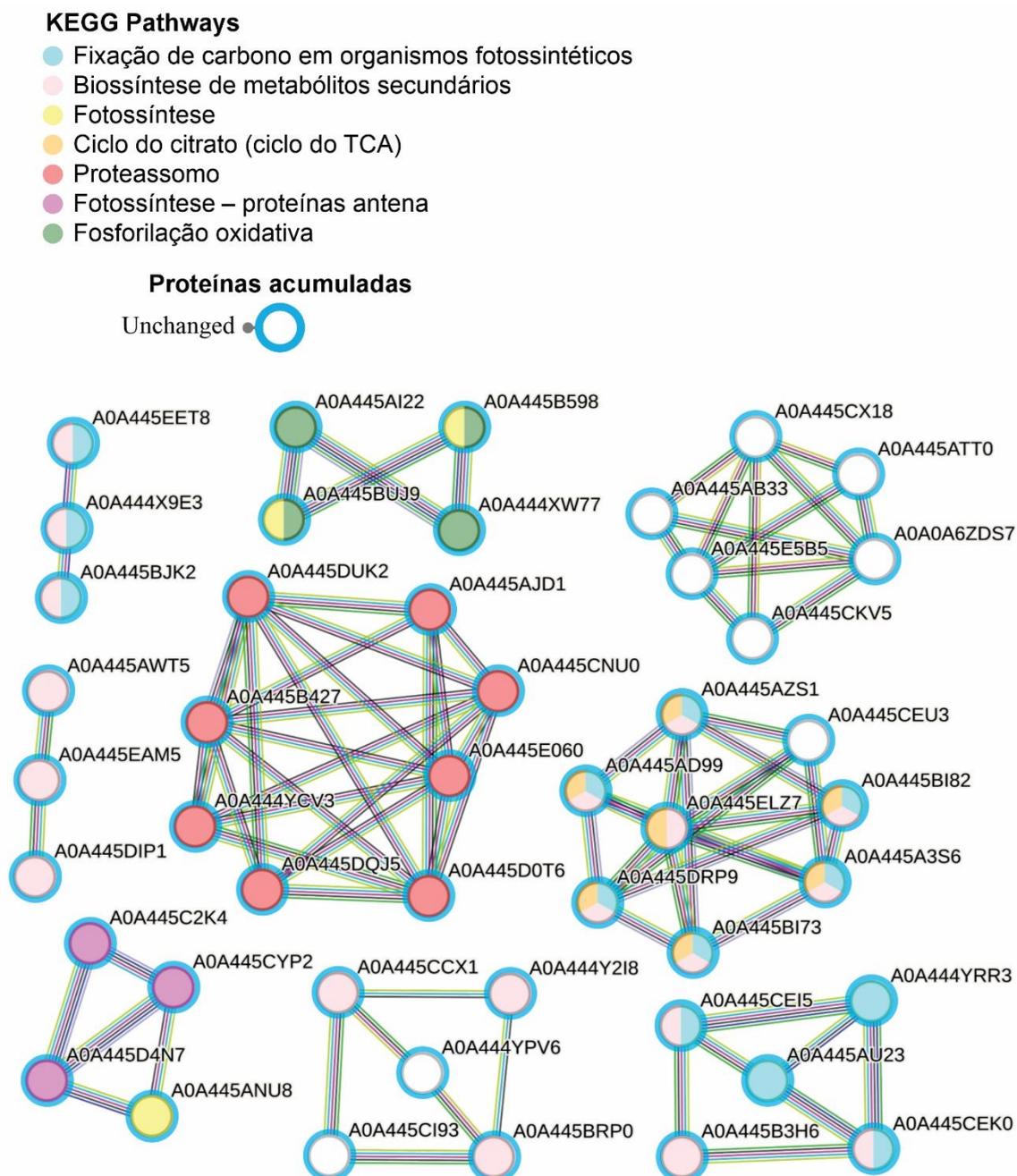


Figura 4. Análise de enriquecimento da via KEGG e rede de interação proteína-proteína com base em proteínas identificadas em plântulas de *A. lebbbeck* após 12 dias de germinação, comparando concentrações de 4/0 mM de sulfato de ferro (II). Observação: Os círculos (nó) representam proteínas. O círculo azul ao redor das proteínas representa proteínas *unchanged*. Apenas os primeiros vizinhos são mostrados nas interações. Todas as interações previstas na rede tiveram confiança > 0,9 de acordo com o escore combinado do STRING. Cores diferentes indicam diferentes proteínas de acordo com a via KEGG. A linha reta mostra a interação entre as proteínas. As linhas representam a existência dos sete tipos de evidências usadas na predição das associações. Linha vermelha - indica a presença de evidência de fusão; Linha verde - evidência de vizinhança; Linha azul - evidência de coocorrência; Linha roxa - evidência experimental; Linha amarela - evidência de mineração de texto; Linha azul claro - evidência de banco de dados; Linha preta - evidência de coexpressão.

KEGG Pathways

- Fixação de carbono em organismos fotossintéticos
- Biossíntese de metabólitos secundários
- Fotossíntese
- Ciclo do citrato (ciclo do TCA)
- Proteassomo
- Fotossíntese - proteínas antena
- Fosforilação oxidativa
- Ribossomo

Proteínas diferencialmente acumuladas

Up-acumulada Down-acumulada
Única 0 mM

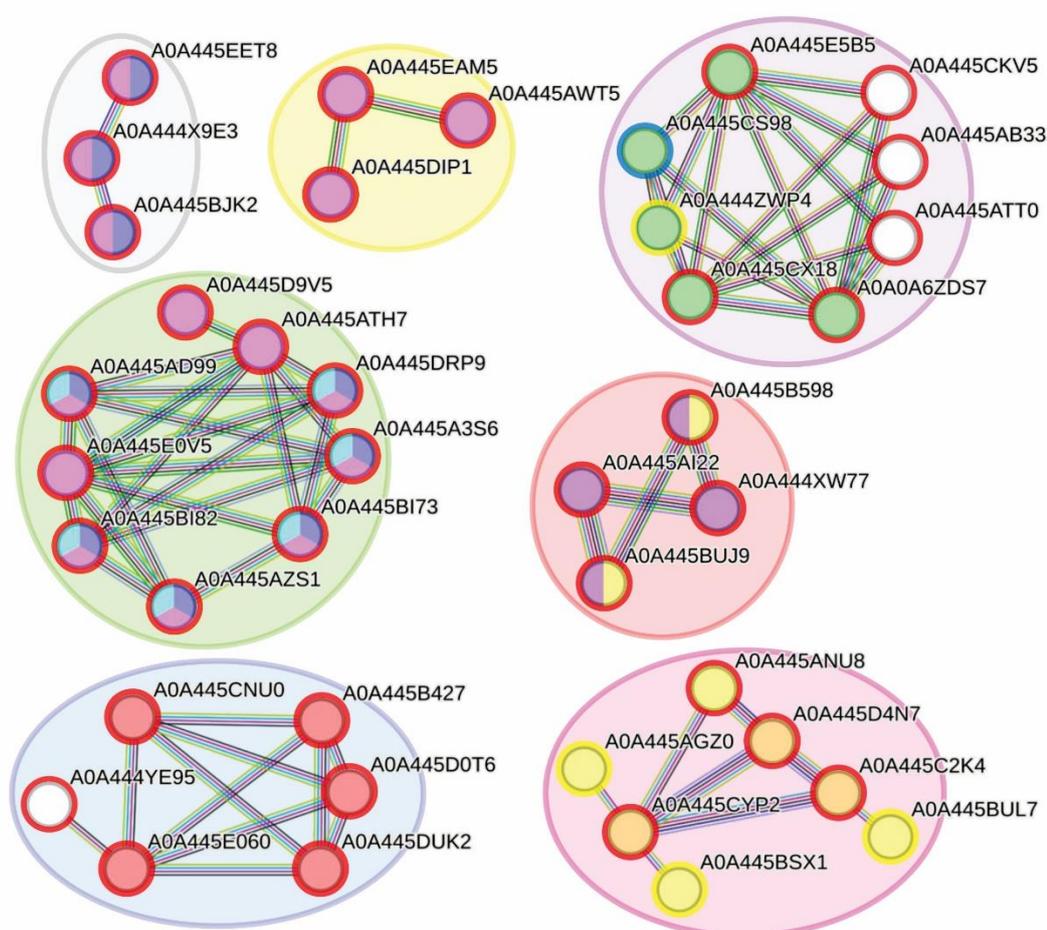


Figura 5. Análise de enriquecimento da via KEGG e rede de interação proteína-proteína com base nas DAPs em plântulas de *A. lebeck* obtidas após 12 dias de incubação, comparando 24/0 mM. Observação: Os círculos (nó) representam proteínas. O círculo azul, vermelho e amarelo ao redor das proteínas representam proteínas *up*-acumuladas, *down*-acumuladas e únicas, respectivamente. Apenas os primeiros vizinhos são mostrados nas interações. Todas as interações previstas na rede tiveram confiança > 0,9 de acordo com o escore combinado do STRING. Cores diferentes indicam diferentes proteínas de acordo com a via KEGG. A linha reta mostra a interação entre as proteínas. As linhas representam a existência dos sete tipos de evidências usadas na predição das associações. Linha vermelha - indica a presença de evidência de fusão; Linha verde - evidência de vizinhança; Linha azul - evidência de coocorrência; Linha roxa - evidência experimental; Linha amarela - evidência de mineração de texto; Linha azul claro - evidência de banco de dados; Linha preta - evidência de coexpressão. Cada *cluster* de proteínas é representado por cores, a saber: roxo, amarelo, azul, verde, cinza, vermelho e rosa.

KEGG Pathways

- Fixação de carbono em organismos fotossintéticos
- Biossíntese de metabólitos secundários
- Fotossíntese
- Ciclo do citrato (ciclo do TCA)
- Proteassomo
- Fotossíntese - proteínas antena
- Fosforilação oxidativa
- Ribossomo

Proteínas diferencialmente acumuladas

Up-acumulada Única 4 mM ● Down-acumulada

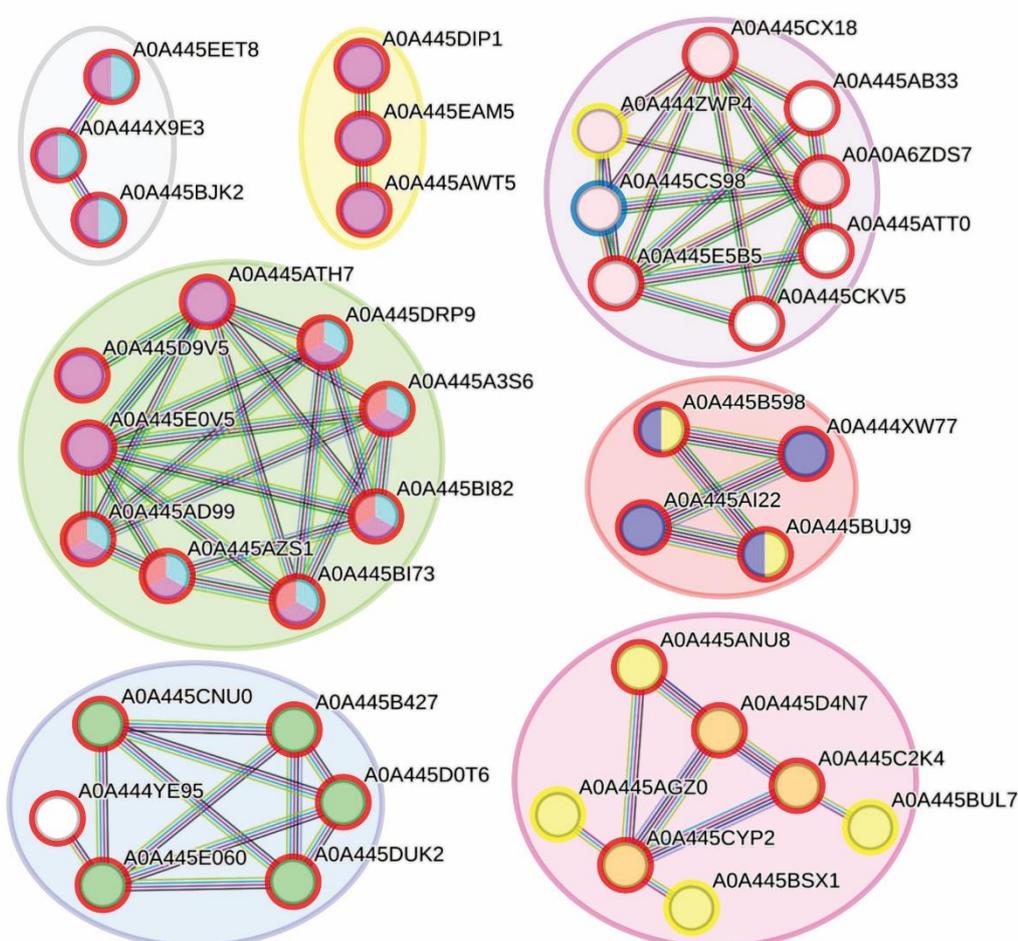


Figura 6. Análise de enriquecimento da via KEGG e rede de interação proteína-proteína com base nas DAPs em plântulas de *A. lebbeck* obtidas após 12 dias de incubação, comparando 24/4 mM. Observação: Os círculos (nó) representam proteínas. O círculo azul, vermelho e amarelo ao redor das proteínas representam proteínas *up*-acumuladas, *down*-acumuladas e únicas, respectivamente. Apenas os primeiros vizinhos são mostrados nas interações. Todas as interações previstas na rede tiveram confiança > 0,9 de acordo com o escore combinado do STRING. Cores diferentes indicam diferentes proteínas de acordo com a via KEGG. A linha reta mostra a interação entre as proteínas. As linhas representam a existência dos sete tipos de evidências usadas na predição das associações. Linha vermelha - indica a presença de evidência de fusão; Linha verde - evidência de vizinhança; Linha azul - evidência de coocorrência; Linha roxa - evidência experimental; Linha amarela - evidência de mineração de texto; Linha azul claro - evidência de banco de dados; Linha preta - evidência de coexpressão. Cada *cluster* de proteínas é representado por cores, a saber: roxo, amarelo, azul, verde, cinza, vermelho e rosa.

5.3. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) nos pigmentos fotossintéticos.

A presença de 4 e 24 mM de sulfato de ferro (II) resultou em um impacto negativo nos níveis de clorofila *a* (Figura 7a), clorofila total (Figura 7c) e carotenoides (Figura 7d) em comparação com as plântulas do controle. O tratamento com 24 mM de sulfato de ferro (II) resultou em uma redução significativa no conteúdo de clorofila *b* (Figura 7b) em comparação com as plântulas crescidas em 0 e 4 mM.

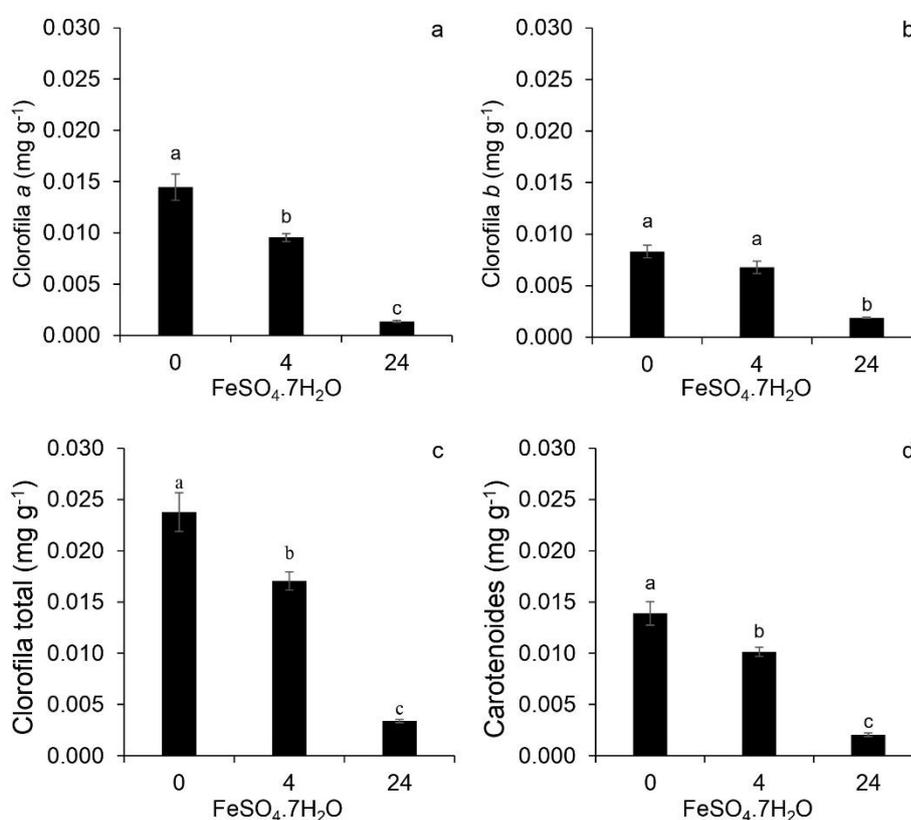


Figura 7. Conteúdo de clorofila *a* (a), *b* (b), clorofila total (c) e carotenoides (d) em plântulas de *A. lebeck* obtidas após 12 dias de incubação em diferentes concentrações (0, 4 e 24 mM) de sulfato de ferro (II). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ($n = 3$; CV clorofila *a* = 15,78%; CV clorofila *b* = 14,89%; CV clorofila total = 14,20%; CV carotenoides = 14,33%).

5.4. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) nos conteúdos endógenos de AIA, ABA, GA, JA, SA e ACC em plântulas.

As plântulas crescidas sob a concentração mais elevada de sulfato de ferro (II) mostraram uma diminuição significativa no conteúdo endógeno de AIA (Figura 8a), ABA (Figura 8b), JA (Figura 8d) e SA (Figura 8e), e um aumento significativo nos conteúdos de ACC (Figura 8f), em comparação com as plântulas crescidas em 0 e 4 mM de sulfato de ferro (II). O conteúdo de GA3 não foi afetado significativamente (Figura 8c) entre os tratamentos.

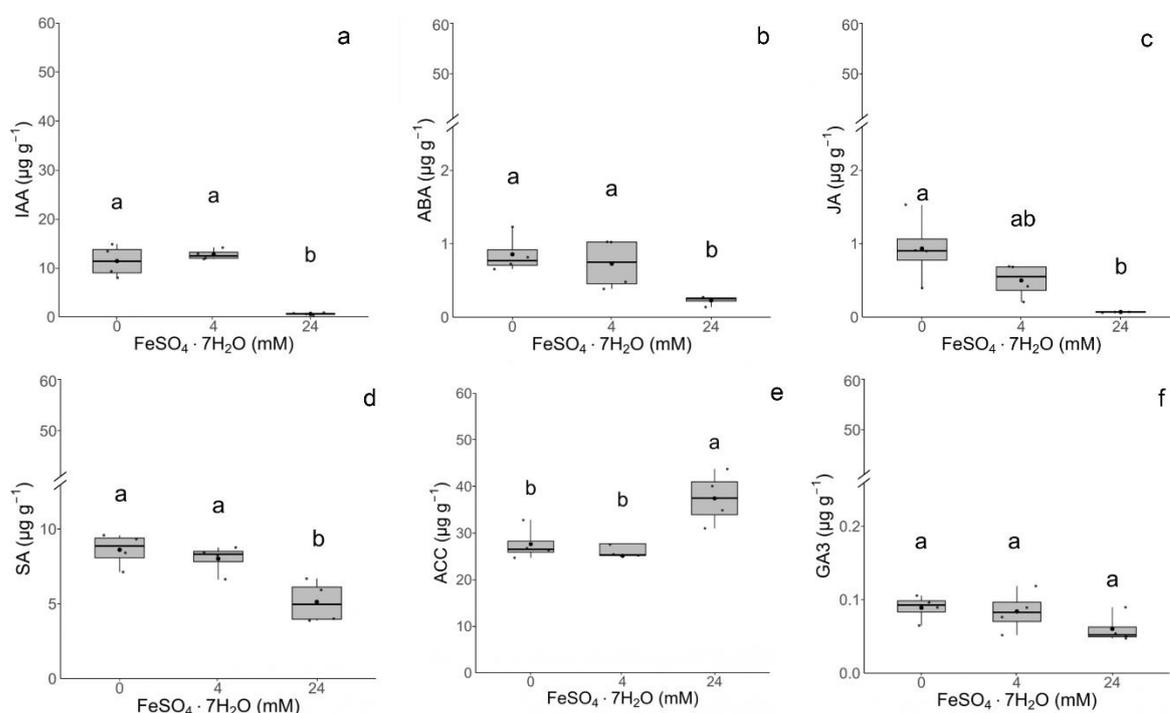


Figura 8. Conteúdo endógeno de AIA (a), ABA (b), JA (c), SA (d), ACC (e) e GA3 (f) em plântulas de *A. lebeck* obtidas após 12 dias de incubação em diferentes concentrações (0, 4 e 24 mM) de sulfato de ferro (II). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.5. Efeito das concentrações de sulfato de ferro (II) no conteúdo de nutrientes

O sulfato de ferro (II) exerceu uma influência significativa no conteúdo de nutrientes tanto na raiz quanto na parte aérea das plântulas de *A. lebeck* (Tabela 1). Na porção das raízes, as concentrações de 4 e 24 mM de sulfato de ferro (II) promoveram um aumento no conteúdo de ferro (Fe), manganês (Mn), magnésio

(Mg) e enxofre (S). Além disso, na concentração de 24 mM de sulfato de ferro (II), observou-se um aumento significativo nos níveis de boro (B), cálcio (Ca), potássio (K) e nitrogênio (N) em comparação com 0 e 4 mM. No entanto, o conteúdo de cobre (Cu) e fósforo (P) diminuiu na concentração de 24 mM, enquanto os níveis de molibdênio (Mo) e zinco (Zn) permaneceram inalterados quando as plântulas foram expostas a diferentes concentrações de sulfato de ferro (II) (0, 4 e 24 mM).

Na parte aérea das plântulas, os níveis de nutrientes foram afetados apenas quando submetidos à concentração de 24 mM de sulfato de ferro (II), resultando em um aumento nos conteúdos de Fe, Mn, Zn e S.

Tabela 1. Concentração de nutrientes nas raízes e partes aéreas das plântulas de *A. lebeck* após 12 dias de incubação em diferentes concentrações (0, 4 e 24 mM) de sulfato de ferro (II). Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças entre si ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro (II) no mesmo tecido (parte aérea ou raiz). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tecidos (partes aéreas e raízes) no mesmo tratamento de concentração de sulfato de ferro (II). CV = coeficiente de variação. (n = 3)

Nutrientes (mg kg ⁻¹ MS)	Raiz			Parte aérea			CV (%)
	FeSO ₄ (mM)			FeSO ₄ (mM)			
	0	4	24	0	4	24	
Micronutrientes							
B	23,56aB	20,03aB	48,01bA	14,70aA	23,80aA	22,75aA	27,71
Cu	47,58aA	45,87aA	35,37aB	36,39bA	31,52bA	36,59aA	6,24
Fe	58,17aC	630,56aB	3466,29aA	44,30aC	320,10bB	2589,83bA	9,61
Mo	0,48aA	0,31aA	0,43aA	0,51aA	0,52aA	0,36aA	32,26
Mn	12,86aC	24,46aB	54,99aA	14,07aB	14,64bB	45,09bA	7,24
Zn	35,55aA	34,87aA	47,62aA	24,69bB	23,76bB	30,03bA	12,77
Macronutrientes							
Ca	0,39bB	0,35bB	1,43bA	3,76aA	4,06aA	3,85aA	10,43
K	40,65aB	40,28aB	49,27aA	27,22bA	26,33bA	23,99bA	4,19
Mg	4,92bC	4,23bB	8,43aA	7,83aA	7,19aA	7,37bA	5,63
P	5,27aA	4,99aA	4,19aB	4,06bA	3,89bA	4,19aA	4,70
S	5,74aC	7,34aB	13,66aA	5,23aB	5,50bB	8,43bA	3,98
N	52,75aB	51,17bB	63,00aA	56,83aA	60,25aA	55,50bA	6,83

6. DISCUSSÃO

O ferro desempenha um papel crucial no crescimento e desenvolvimento das plantas (Müller et al., 2017); no entanto, em excesso, torna-se prejudicial devido à sua tendência de reagir com o oxigênio, gerando ERO (Krohling et al., 2016; Gao e Dubos, 2021), o que afeta negativamente as plantas.

Na presente pesquisa, o aumento na concentração de sulfato de ferro (II) teve um impacto significativo na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *A. lebeck*. A porcentagem de germinação das sementes foi significativamente reduzida nas concentrações de 16, 24 e 32 mM de sulfato de ferro (II), demonstrando o efeito fitotóxico do Fe^{2+} . Um estudo realizado com sementes de *C. fissilis* corrobora com esses resultados, mostrando que concentrações elevadas (8 e 10 mM) de sulfato de ferro (II) tiveram um efeito inibitório na germinação (Silva et al., 2023).

Além de inibir a germinação, o aumento nas concentrações de sulfato de ferro (II) demonstrou um impacto no crescimento das plântulas de *A. lebeck*, resultando em restrição tanto no crescimento das raízes quanto da parte aérea nos tratamentos com 16, 24 e 32 mM de sulfato de ferro (II). Esse efeito foi corroborado por estudos anteriores realizados com plântulas de *C. fissilis* (Silva et al., 2023), os quais também indicaram uma redução no comprimento radicular e aéreo em resposta a altas concentrações de sulfato de ferro (II). Resultados similares foram observados em plântulas de *O. sativa*, tanto em condições de deficiência quanto de excesso de Fe^{2+} (Zhang et al., 2022). A presença de metais, como Fe^{2+} , pode

causar danos oxidativos, interferir no metabolismo e reduzir a atividade de enzimas cruciais, impactando diretamente o crescimento das plântulas (Silva et al., 2023).

Altas concentrações de sulfato de ferro (II) exerceram uma influência significativa na biomassa de plântulas de *A. lebeck*, resultando em uma redução tanto na matéria fresca (MF) quanto na matéria seca (MS) das raízes e da parte aérea. Da mesma forma, níveis elevados de Fe^{2+} podem desencadear fitotoxicidade, causando uma diminuição na MF e MS em plântulas de *C. fissilis* (Silva et al., 2023). Resultados semelhantes foram observados em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, demonstrando reduções de 50% na MF e MS da parte aérea, e 60% na MF e MS das raízes, quando expostas a uma concentração de 50 mM de sulfato de ferro (II) (Tisarum et al., 2023). Esses resultados destacam a forte influência do Fe^{2+} na redução da acumulação de biomassa nessas espécies em concentrações elevadas de sulfato de ferro (II).

Pode-se observar, nesta pesquisa, que houve um aumento no acúmulo das proteínas glutatona peroxidase (A0A445DTP6) e glutatona S-transferase (A0A444Y2J0), um grupo de proteínas envolvidas nas respostas ao estresse. Essas proteínas desempenham um papel importante na remoção de ERO (Bela et al., 2015). Com o aumento do estresse causado pelo excesso de ferro, há um aumento na indução de ERO, desencadeando múltiplas respostas de detoxificação de ERO (Zhang et al., 2022).

As proteínas glutatona peroxidase (A0A445DTP6) são peroxidases tiólicas não-heme que catalisam a redução de H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos para água (Passaia et al., 2013), participando de vários processos fisiológicos e desenvolvimento, incluindo defesas contra estresses abióticos (Bela et al., 2015), e atuando na proteção das células vegetais contra danos oxidativos (Kumar et al., 2020).

As glutatona S-transferase (A0A444Y2J0) são proteínas multifuncionais que desempenham papéis essenciais em uma variedade de processos intracelulares, envolvidas na detoxificação de herbicidas, bem como desempenhando um papel crucial na proteção das plantas contra danos causados por metais traço (Mohsenzadeh et al., 2011). No arroz, a abundância das proteínas glutatona S-transferase aumentou significativamente sob estresse excessivo de Fe^{2+} (Zhang et al., 2022). Em *Cicer arietinum* L., tanto as atividades de glutatona

peroxidase quanto de glutathione S-transferase aumentaram sob estresse por metal traço (AsIII-25 μ M, AsV-250 μ M, Cd-500 μ M e Cr(VI)-300 μ M) (Kumar et al., 2020). O aumento na abundância dessas proteínas nas comparações 24/0 mM e 24/4 mM de sulfato de ferro (II) sugere que a plântula está aumentando suas defesas antioxidantes para lidar com o estresse oxidativo causado pela toxicidade do sulfato de ferro (II), ajudando a reduzir danos às estruturas celulares.

As proteínas do fator de alongação Tu (A0A445CKV5, A0A445ATT0, A0A445AB33) foram menos acumuladas tanto nas comparações 24/0 mM quanto 24/4 mM de sulfato de ferro (II). As proteínas do fator de alongação Tu são importantes, pois desempenham um papel central na fase de alongação da síntese de proteínas (Fu et al., 2012). As funções do fator de alongação Tu incluem transportar o complexo aminoacil-tRNA para o sítio A do ribossomo durante a biossíntese de proteínas (Li et al., 2018).

Essas proteínas têm sido objeto de estudo em várias plantas enfrentando condições de estresse abiótico, como salinidade, seca e temperaturas extremas (Momcilovic e Ristic, 2007). Elas atuam como chaperonas, interagindo com proteínas desdobradas e desnaturadas, protegendo-as da agregação térmica e inativação (Fu et al., 2012). A redução no acúmulo de proteínas do fator de alongação Tu destaca sua sensibilidade ao estresse causado pelo excesso de ferro, o que pode resultar em alterações na síntese de proteínas e danos no processo de desenvolvimento.

Na análise da rede de interação proteína-proteína, um grupo de proteínas relacionadas ao proteassoma foi identificado, incluindo a subunidade beta do proteassoma (A0A445DUK2, A0A445D0T6, A0A445CNU0, A0A445B427) e a subunidade regulatória não-ATPase 2 homóloga do proteassoma 26S (A0A445E060). Esse conjunto de proteínas foram *down*-acumuladas em plântulas com 24 mM em comparação com 0 mM (comparação 24/0 mM) e com 4 mM (comparação 24/4 mM) de sulfato de ferro (II).

O proteassoma é um complexo proteolítico multi-subunidade, dependente de ATP, composto por uma partícula central de 20S (CP) e uma partícula reguladora de 19S (Glickman et al., 1998), responsável pelo reconhecimento do substrato, desubiquitinação, desdobramento do substrato e clivagem em peptídeos curtos (Tomko e Hochstrasser, 2013). Garantir a manutenção de um sistema altamente

coordenado e específico para a degradação de proteínas individuais é essencial para a sobrevivência de um organismo (Ali e Baek, 2020). No entanto, uma redução na atividade do proteassomo pode resultar em taxas diminuídas de degradação de proteínas regulatórias, levando a uma redução na eficiência e precisão dos processos de transdução de sinais (Kurepa e Smalle, 2008). Além disso, a diminuição da atividade do proteassomo contribui para o acúmulo de proteínas danificadas, intensificando assim a sensibilidade ao estresse (Kurepa e Smalle, 2008).

As proteínas acil-coenzima A oxidase 4, peroxissomal e a proteína desidrogenase 3-hidroxiacil-CoA tiveram seu acúmulo reduzido em ambas as comparações, 24/0 e 24/4 mM. Essas proteínas desempenham um papel crucial na via metabólica conhecida como β -oxidação de ácidos graxos (Goepfert e Poirier, 2007). A proteína acil-coenzima A oxidase 4, peroxissomal, catalisa o primeiro passo da β -oxidação, convertendo ácidos graxos acil-CoA em 2-trans-enoil-CoA, um processo que libera peróxido de hidrogênio como subproduto (Arent et al., 2008). Enquanto isso, a proteína desidrogenase 3-hidroxiacil-CoA catalisa o terceiro passo da β -oxidação, decompondo ácidos graxos de cadeia longa em unidades de dois carbonos chamadas acetil-CoA, que podem ser usadas para produzir ATP (Baker et al., 2006). A diminuição na acumulação dessas proteínas pode afetar a capacidade das plântulas de metabolizar eficientemente ácidos graxos e manter o equilíbrio metabólico, impactando o crescimento, desenvolvimento e resposta ao estresse.

A proteína malato desidrogenase (A0A445DRP9, A0A445BI82, A0A445BI73, A0A445AZS1, A0A445AD99, A0A445A3S6) é uma enzima chave no ciclo de Krebs, também conhecido como ciclo do ácido cítrico ou ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), onde desempenha um papel essencial na oxidação do malato, um produto da reação catalisada pela fumarase, para formar oxaloacetato (OAA), enquanto NAD^+ é reduzido a NADH (Tomaz et al., 2010). Por sua vez, as proteínas malato sintase (A0A445ATH7) e a isocitrato liase (A0A445E0V5, A0A445D9V5) são duas enzimas chave do ciclo glioxilato, uma via metabólica alternativa ao ciclo de Krebs (Ahn et al., 2016). Essas proteínas também foram *down*-acumuladas em ambas as comparações, 24/0 e 24/4 mM, o que pode ter causado danos ao

metabolismo energético e à síntese de carboidratos, afetando negativamente o crescimento e desenvolvimento das plântulas de *A. lebeck*.

As proteínas ATPase F1/V1/A1 complexo subunidade alfa/beta domínio N-terminal (A0A445B598), ATPase F1/V1/A1 complexo subunidade alfa/beta domínio de ligação a nucleotídeo (A0A445AI22), ATPase de dois setores que transporta H⁺ (A0A445BUJ9, A0A445DVJ9), subunidade alfa da ATP sintase (A0A445ED48, A0A445A0G3) e subunidade beta da ATP sintase (A0A444XW77) compõem um grupo de proteínas relacionadas à síntese de ATP que mostraram diminuição na acumulação em plântulas em concentrações mais altas em comparação com o controle (comparação 24/0 mM) de sulfato de ferro (II).

A ATP sintase, localizada na membrana mitocondrial interna ou tilacoides do cloroplasto, desempenha um papel crucial na catalisação da etapa terminal da fosforilação oxidativa, produzindo ATP rico em energia a partir do gradiente de prótons gerado pelo transporte de elétrons (Liu et al., 2021). O estresse induzido por metais traço tem um impacto negativo na acumulação de proteínas envolvidas na síntese de ATP em plantas (Liu et al., 2016; Zhang et al., 2020). Esses resultados indicam que o estresse induzido por um excesso de sulfato de ferro (II) pode comprometer o sistema energético e o processo de síntese de proteínas.

A proteína intensificadora evolutiva de oxigênio 1 (OEE1) foi implicada na evolução do oxigênio fotossintético e está associada ao complexo do fotossistema II (Feng et al., 2008). Neste estudo, a proteína intensificadora evolutiva de oxigênio 1 (A0A445ANU8) foi reduzida em plântulas em ambas as comparações, 24/0 mM e 24/4 mM de sulfato de ferro (II), destacando os efeitos do Fe no fotossistema II. Em plântulas de arroz expostas ao ozônio, houve uma redução na abundância da proteína intensificadora de evolução de oxigênio 1, sugerindo a suscetibilidade do aparato fotossintético a níveis elevados desse poluente (Feng et al., 2008). O sulfato de ferro (II) resultou em alterações negativas na acumulação de proteínas OEE1, indicando que mudanças na abundância dessas proteínas podem afetar significativamente a eficiência do processo fotossintético em plântulas de *A. lebeck*.

A toxicidade do Fe representa uma perturbação complexa capaz de impactar vários aspectos fisiológicos (Müller et al., 2015) e bioquímicos da planta (Zhang et al., 2022), afetando até mesmo componentes vitais como as clorofilas,

que desempenham um papel essencial na fotossíntese, e seu conteúdo é crucial para o desenvolvimento da planta (Xu et al., 2015). Neste estudo, foi possível observar uma redução na acumulação da proteína de ligação à clorofila *a-b*, cloroplasto (A0A445D4N7, A0A445CYP2, A0A445C2K4) em plântulas de ambos, as comparações de 24/0 mM e 24/4 mM de sulfato de ferro (II). Essa proteína pertence à família de proteínas de ligação à clorofila *a/b* do complexo de captura de luz (LHC) e desempenha um papel crucial na absorção e transferência de energia luminosa (Jansson, 1999). Essas proteínas se ligam a moléculas de pigmento para formar um complexo essencial na captura e transporte de energia durante o processo de fotossíntese (Zhao et al., 2020). A diminuição na acumulação dessas proteínas em resposta à alta concentração de ferro sugere sua sensibilidade à toxicidade de Fe, resultando em danos ao aparato fotossintético e, conseqüentemente, no crescimento das plântulas.

Os sintomas de fitotoxicidade de Fe²⁺ são caracterizados pelo surgimento de manchas nas folhas, começando nas pontas e progredindo em direção à base da folha (Pereira et al., 2013). Um estudo mostrou que em *C. roseus* cultivada em condições fitotóxicas de Fe²⁺, ocorreu bronzeamento das folhas, com manchas variando de marrom escuro a preto, juntamente com necrose, clorose e senescência foliar (Tisarum et al., 2023). Em *A. lebbbeck*, sob altas concentrações de sulfato de ferro (II), há uma evidente alteração na coloração das plântulas, caracterizada por clorose e o surgimento de manchas necróticas. Essa alteração pode estar relacionada a uma redução na acumulação de proteínas envolvidas na biossíntese de clorofila (*Chl*), a partir da via metabólica do tetrapirrol composta por 15 etapas (Liang et al., 2023). Notavelmente, a proteína NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR) (A0A445DYM5, A0A445BZ81) mostrou uma redução na acumulação nas comparações de 24/0 mM e 24/4 mM de sulfato de ferro (II). Essa proteína desempenha um papel crucial na 13^a etapa da biossíntese de *Chl*, promovendo o processo de esverdeamento nas plantas (Yuan et al., 2012; Liang et al., 2023). Esses achados destacam a influência direta da concentração de sulfato de ferro (II) na acumulação dessas proteínas e, conseqüentemente, no crescimento e coloração das plântulas.

Nesta pesquisa, corroborando com a redução na acumulação de proteínas relacionadas aos pigmentos fotossintéticos, observou-se uma diminuição

significativa no teor de clorofilas *a*, *b* e carotenoides à medida que as concentrações de sulfato de ferro (II) aumentaram. Resultados semelhantes foram identificados em plântulas de *Pisum sativum* L., onde o excesso de Fe^{2+} causou uma redução nos níveis de clorofila, diminuiu a taxa de transporte de elétrons e desativou o centro de reação do fotossistema II (Xu et al., 2015).

Os carotenoides desempenham um papel crucial na absorção de luz e na proteção do complexo antena contra danos oxidativos, devido à sua capacidade de neutralizar as ERO que naturalmente se formam durante o processo fotossintético (Pinto et al., 2003). Em *Glycine max* (L.) Merr., o excesso de ferro levou à redução de pigmentos fotossintéticos (*Chl a*, *b* e carotenoides) (Lapaz et al., 2020), confirmando que a absorção excessiva de Fe causa alterações negativas nos mecanismos fotossintéticos (Krohling et al., 2016). Esses resultados destacam o impacto negativo da fitotoxicidade de Fe^{2+} na biossíntese de pigmentos essenciais para a fotossíntese, sugerindo a sensibilidade dessas moléculas à presença excessiva de Fe e enfatizando as consequências prejudiciais que concentrações elevadas desse metal podem ter na eficiência fotossintética da planta.

Uma variedade de fitohormônios, como auxina e ABA, são conhecidos por estarem envolvidos no desenvolvimento e na arquitetura das raízes (Passaia et al., 2013). A auxina desempenha um papel fundamental como um dos principais hormônios no crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando também como molécula sinalizadora durante vários estresses ambientais (Mathur et al., 2022).

Os resultados desta pesquisa revelaram uma redução no conteúdo endógeno de AIA em plântulas de *A. lebbbeck* quando submetidas a uma concentração de 24 mM de sulfato de ferro (II). Em plântulas de *A. thaliana* tratadas com Cd, os níveis de AIA apresentaram uma redução significativa em comparação com o grupo controle (Hu et al., 2013). O estresse por metais traço leva a mudanças na distribuição espacial de AIA nos tecidos vegetais, o que pode ser causado por alterações na distribuição de proteínas PIN FORMED (PIN2) (Mathur et al., 2022) e PIN1 (Yuan et al., 2013). Mudanças na distribuição de AIA, por sua vez, contribuíram para a inibição do alongamento das raízes (Sun et al., 2010). Os dados sugerem que a regulação dinâmica dos níveis de AIA desempenha um papel crucial nas respostas das plântulas ao estresse por metais traço, influenciando o crescimento das raízes.

O hormônio vegetal ABA é uma ferramenta essencial para o mecanismo de desenvolvimento e respostas robustas ao estresse causado por estímulos ambientais (Ranjan et al., 2021). Por sua vez, o GA regula vários atributos fisiológicos e bioquímicos importantes das plantas, incluindo a germinação de sementes, o crescimento de plântulas, o alongamento das raízes e o crescimento do caule (Ghuge et al., 2023). ABA e GA são dois hormônios que frequentemente exibem efeitos antagônicos.

Nos resultados deste trabalho, foi possível observar uma diminuição nos níveis endógenos de ABA em plântulas submetidas a uma concentração de 24 mM de sulfato de ferro (II); no entanto, os níveis endógenos de GA não foram afetados pelo aumento na concentração de sulfato de ferro (II). Durante o processo de germinação de sementes de *O. sativa* tratadas com Pb, a síntese de GA foi reduzida, enquanto a síntese de ABA foi aumentada (Wang et al., 2020). Por outro lado, plântulas de *Oryza glaberrima* Steud. tratadas com Fe mostraram um aumento na concentração de ABA (Majerus et al., 2009), que regula muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo a germinação de sementes e a inibição do alongamento das raízes (Thole et al., 2014). No entanto, em plântulas de *A. thaliana* sob excesso de Fe, a sinalização mediada por ABA não é necessária para a ação inibitória do Fe no crescimento da raiz primária (Li et al., 2015).

O JA desempenha um papel essencial no crescimento, desenvolvimento e respostas a estresses bióticos e abióticos das plantas (Ranjan et al., 2021). Por outro lado, o SA tem sido reconhecido por seu papel fundamental na regulação do crescimento, desenvolvimento e respostas imunes das plantas (Bari e Jones, 2009). Nesta pesquisa, foi observada uma diminuição no conteúdo endógeno de JA e SA quando plântulas foram expostas a uma concentração de 24 mM de sulfato de ferro (II). Esse resultado contrasta com a resposta típica de aumento nos níveis de JA em plantas quando expostas a metais traço, adicionando uma perspectiva intrigante a essa interação. Na presença de Cd, foi observado que a deficiência endógena de JA aumentou a sensibilidade de plântulas de tomate ao estresse por Cd, implicando que o JA exerce regulação positiva na resposta do tomate ao estresse induzido por Cd (Zhao et al., 2016). O estresse induzido por Cd aumenta os níveis de JA nas raízes de *A. thaliana*, suprimindo a expressão dos genes

AtIRT1, AtHMA2 e AtHMA4, responsáveis pela captação de Cd e translocação de longa distância, respectivamente (Lei et al., 2020). Enquanto a adição exógena de JA pode diminuir concentrações fitotóxicas de metais traço nas plantas, inibindo a expressão de genes envolvidos na absorção de metais (Ali et al., 2023).

O SA desempenha um papel crucial nos sistemas de defesa antioxidante, pois tem a capacidade de aumentar as atividades antioxidantes nas plantas sob condições de estresse, levando a níveis reduzidos de ERO (Emamverdian et al., 2020). No entanto, a deficiência de SA ou níveis excessivamente altos de SA aumentam a susceptibilidade das plantas ao estresse abiótico (Yuan e Lin, 2008). Esses resultados apontam para a influência direta do excesso de sulfato de ferro (II) no conteúdo endógeno de JA e SA, apresentando um cenário de regulação hormonal complexo em resposta ao estresse induzido por esse elemento.

O etileno, um fitohormônio relevante associado ao estresse, desempenha um papel crítico na modulação do crescimento das raízes. Este fitohormônio é produzido a partir da metionina através de S-adenosil-L-metionina (SAM) e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), catalisado pela ACC sintase (ACS) e pela ACC oxidase (ACO), respectivamente (Hyun e Kieber, 2005). ACS e ACO são codificados por famílias multigênicas e regulados por vários fatores bióticos e abióticos (Hyun e Kieber, 2005). Neste estudo, ao contrário dos outros fitohormônios mencionados, foi observado um aumento no teor endógeno de ACC na concentração de 24 mM de sulfato de ferro (II).

O etileno pode desempenhar um papel crucial na absorção de metais traço, como Cd, onde a redução na produção de etileno está associada a uma menor acumulação de Cd na planta (Ravanbakhsh et al., 2019). Em plantas de *A. thaliana*, a presença de Cd induziu a biossíntese de ACC e etileno, resultando em uma redução significativa na biomassa e no crescimento das raízes, enquanto mutantes *acs2-1acs6-1* exibiram um efeito positivo na biomassa foliar (Schellingen et al., 2014).

Destarte, um estudo com *A. thaliana* indica que a evolução do etileno contribui para a tolerância ao crescimento da raiz primária ao excesso de Fe (Li et al., 2015). Os efeitos prejudiciais do estresse por metais traço, como Fe, estão principalmente relacionados à redução do comprimento da raiz primária, diminuição da proliferação de raízes laterais e diminuição da área foliar (Mathur et al., 2022).

Em plântulas de *A. thaliana*, o excesso de Fe reduziu o crescimento da raiz primária diminuindo tanto a alongação quanto a divisão celular, e esse papel inibitório é parcialmente aliviado por um aumento no teor de etileno (Li et al., 2015).

Em *O. glaberrima*, tratamentos com concentrações de 250 e 500 mg L⁻¹ de sulfato de ferro (II) estimularam a biossíntese de etileno (Majerus et al., 2007). Além disso, altas concentrações de CuSO₄ (40 - 60 µM) inibiram o alongamento da raiz primária em plântulas de *A. thaliana* selvagens e mutantes insensíveis ao etileno *ein2-1*, indicando que o etileno não está associado à inibição da raiz primária causada por excesso de Cu (Yuan et al., 2013). Genes que codificam ACS e ACO, as duas enzimas-chaves responsáveis pela síntese de etileno, foram regulados transcricionalmente pelo excesso de Fe (Li et al., 2015), e a presença de ACC, um precursor do etileno, aliviou a inibição do crescimento da raiz primária causada pelo excesso de Fe, enquanto inibidores da biossíntese de etileno (aminoetoxivinilglicina e ácido aminooxiacético) intensificaram esse efeito (Li et al., 2015). Os resultados deste trabalho destacam a interação complexa entre o ACC, precursor do fitohormônio etileno, e o estresse induzido pelo excesso de Fe em plântulas de *A. leibbeck*. Essa descoberta sugere uma regulação específica deste precursor de etileno sob condições de estresse de sulfato de ferro (II). No entanto, é importante observar que mais estudos são necessários para uma compreensão mais aprofundada da relação entre etileno e crescimento das raízes.

O acúmulo excessivo de Fe pode levar a desequilíbrios nutricionais graves nas plantas, interferindo na acumulação de nutrientes tanto na raiz quanto na parte aérea (Silva et al., 2023). Após a exposição a altas concentrações de sulfato de ferro (II), o sistema radicular das plântulas de *A. leibbeck* exibiu uma coloração marrom, indicando uma leve formação de placas de Fe. A formação de placas de Fe pode mitigar os efeitos dos metais traço (Mitra e Subba, 2022), no entanto, essas placas podem induzir desequilíbrios nutricionais inibindo a absorção de nutrientes (Siqueira-Silva et al., 2012; Silva et al., 2023). Todavia, neste estudo, houve um aumento significativo no teor de Fe nas raízes e partes aéreas das plântulas submetidas aos tratamentos com sulfato de ferro (II), indicando que a formação de placas de Fe pode não ter afetado a absorção desse nutriente. Isso, por sua vez, levou a efeitos fitotóxicos como redução no crescimento (Siqueira-Silva et al., 2012).

Nestes resultados, foi possível constatar um aumento na acumulação de B, Fe, Mn, Ca, K, Mg, S e N nas raízes. Achados semelhantes foram relatados em *C. fissilis*, onde um aumento na concentração de sulfato de ferro (II) elevou os níveis de Fe, Mn, Zn, Ca, S e N nas raízes; no entanto, as concentrações desses nutrientes não foram afetadas pelos tratamentos com sulfato de ferro (II) na parte aérea (Silva et al., 2023). O sulfato de ferro (II) pode induzir mudanças na acumulação de nutrientes nas plantas, e essas mudanças podem variar entre a raiz e a parte aérea (Silva et al., 2023).

Os resultados desta pesquisa apoiam essas observações, indicando que a acumulação de Fe foi significativamente maior nas raízes em comparação com a parte aérea das plântulas, especialmente nas concentrações de 4 e 24 mM de sulfato de ferro (II). O aumento na acumulação de Fe na raiz de *A. lebbbeck* pode estar possivelmente relacionado à compartimentalização restrita desse metal nos vacúolos das células da raiz (Sharma et al., 2016). Essa alta concentração de Fe nos tecidos radiculares sugere que a planta possa empregar esse mecanismo de compartimentalização para proteger as partes aéreas da toxicidade desse elemento (Tisarum et al., 2023). No entanto, a acumulação de Fe nas raízes nas concentrações de 4 e 24 mM, assim como na parte aérea na concentração de 24 mM de sulfato de ferro (II), excedeu o nível crítico de toxicidade de Fe estabelecido em 500 mg kg⁻¹ de MS para as plantas (Pinto et al., 2016; Lapaz et al., 2022).

Além disso, plântulas de *A. lebbbeck* tratadas com 24 mM de sulfato de ferro (II) mostraram uma redução no conteúdo de P e Cu nas raízes. O P pode ter precipitado na placa de Fe, reduzindo sua absorção e acumulação pelas raízes das plântulas sob condições de excesso de Fe, como observado em *C. fissilis* (Silva et al., 2023). O P desempenha um papel fundamental na regulação de respostas fisiológicas e no aumento da tolerância ao estresse abiótico nas plantas. É essencial para diversos processos metabólicos e fisiológicos, incluindo o metabolismo energético, divisão celular, síntese de DNA e biossíntese de fosfolipídios (Khan et al., 2023). No entanto, baixos níveis de P podem comprometer esses processos (Chan et al., 2021). O Cu, por sua vez, em níveis reduzidos, pode desencadear distúrbios no crescimento e desenvolvimento das plantas, exercendo efeitos negativos em processos fisiológicos cruciais, especialmente aqueles relacionados ao transporte de elétrons fotossintéticos (Yruela, 2005).

Concentrações mais baixas de Cu foram encontradas nas raízes de plantas de *O. sativa* quando expostas ao estresse por excesso de Fe, e esse fenômeno também pode ser atribuído à formação de uma placa de Fe atuando como uma barreira que limita a absorção de Cu (Silveira et al., 2007). Estes dados destacam que as mudanças na acumulação de P e Cu nas raízes, como resultado do estresse induzido pelo excesso de Fe, podem ter contribuído para alterações morfofisiológicas, como redução do crescimento radicular e aéreo, bem como danos aos pigmentos fotossintéticos, como observado nas plântulas de *A. leibbeck*.

Os desequilíbrios resultantes do acúmulo excessivo de Fe não apenas comprometem a absorção de nutrientes pela raiz, mas também interferem na distribuição adequada desses elementos por toda a planta, impactando diretamente seu desenvolvimento e crescimento. Além disso, investir em novas pesquisas focadas nos mecanismos de resposta das plantas ao estresse causado pelo excesso de Fe proporcionará uma compreensão mais abrangente desses processos, especialmente no que diz respeito ao perfil proteômico e à modulação da sinalização hormonal. Tais investigações são cruciais para avançar no desenvolvimento de estratégias voltadas para identificar espécies que possam ser usadas na recuperação de áreas contaminadas com Fe.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que altas concentrações (superiores a 8 mM) de sulfato de ferro (II) têm efeitos negativos na germinação de sementes e no crescimento inicial de plântulas de *A. lebeck*.

A concentração mais alta (24 mM) de sulfato de ferro (II) promoveu um aumento na acumulação de proteínas glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferase em comparação com as plântulas não estressadas no controle e 4 mM. Além disso, a diminuição na acumulação de proteínas acil-coenzima A oxidase 4, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, malato desidrogenase, malato sintase, isocitrato liase e proteína intensificadora evolutiva de oxigênio 1, juntamente com proteínas de ligação de clorofila do complexo antena em resposta à presença de sulfato de ferro (II), revela uma relação entre mudanças no perfil proteico e a inibição do crescimento inicial das plântulas sob estresse, afetando o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, além de reduzir os níveis endógenos dos hormônios AIA, ABA, JA e SA, em uma concentração de 24 mM, enquanto aumenta ACC, um precursor de etileno.

Não obstante, tratamentos com sulfato de ferro (II) afetaram a acumulação de nutrientes, aumentando os elementos B, Fe, Mn, Ca, K, Mg, S e N, e diminuindo Cu e P. Apesar de concentrações mais altas de sulfato de ferro (II) apresentarem efeitos fitotóxicos na germinação de sementes e no crescimento inicial das plantas, os resultados indicam o potencial uso desta espécie em programas de recuperação

de áreas contaminadas por Fe, uma vez que esta espécie foi capaz de tolerar concentrações de até 8 mM, abrindo perspectivas promissoras para sua aplicação em contextos de recuperação ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, S., Jung, J., Jang, I.A., Madsen, E.L., Park, W. (2016) Role of glyoxylate shunt in oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 291:11928-11938.
- Ait Elallem, K., Ben Bakrim, W., Ennoury, A., Metougui, M.L., Yasri, A., Boularbah, A. (2022) Germination parameters and responses of antioxidant enzymatic activities of two medicinal plants (*Peganum harmala* L. and *Origanum majorana* L.) under heavy metal stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22:3942-3957.
- Ali, M., Kumar, D., Tikoria, R., Sharma, R., Parkirti, P., Vikram, V., Kaushal, K., Ohri, P. (2023) Exploring the potential role of hydrogen sulfide and jasmonic acid in plants during heavy metal stress. *Nitric Oxide*, 140:16-29.
- Ali, M.S., Baek, K.H. (2020) Protective roles of cytosolic and plastidal proteasomes on abiotic stress and pathogen invasion. *Plants*, 9:832.
- Andrade, G.F., Paniz, F.P., Martins, A.C., Rocha, B.A., da Silva Lobato, A.K., Rodrigues, J.L., Cardoso-Gustavson, P., Masuda, H.P., Batista, B.L. (2018) Agricultural use of Samarco's spilled mud assessed by rice cultivation: A promising residue use? *Chemosphere*, 193:892-902.
- Arent, S., Pye, V.E., Henriksen, A. (2008) Structure and function of plant acyl-CoA oxidases. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46:292-301.
- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24:1-15.

- Arunachalam, B., Natarajan, H.P., Satheesan, A., Ganesan, S., Suthandhirajan, R., Muthuswamy, S., Vellan, M., Selvaraj, N.K. (2023) Yield model and yield table construction in Albizia (*Albizia lebbeck* (L.) under the western agro-climatic zone of Tamil Nadu, Southern India. *Environmental Science and Pollution Research*, 1: 1-7.
- Baker, A., Graham, I.A., Holdsworth, M., Smith, S.M., Theodoulou, F.L. (2006) Chewing the fat: β -oxidation in signalling and development. *Trends in Plant Science*, 11:124-132.
- Bari, R., Jones, J.D.G. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69:473-488.
- Barnabas, L., Ramadass, A., Amalraj, R.S., Palaniyandi, M., Rasappa, V. (2015) Sugarcane proteomics: An update on current status, challenges, and future prospects. *Proteomics*, 15:1658-1670.
- Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., Csiszár, J. (2015) Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology*, 176:192-201.
- Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J.F., Lutts, S., Cai, G., Guerriero, G. (2019) Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 161:98-106.
- Bewley, J.D. (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, 9:1055-1066.
- Bittner, A., Cieśla, A., Gruden, K., Lukan, T., Mahmud, S., Teige, M., Vothknecht, U.C., Wurzinger, B. (2022) Organelles and phytohormones: a network of interactions in plant stress responses. *Experimental Botany*, 73:7165-7181.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Carmo, F.F., Kamino, L.H.Y., Junior, R.T., Campos, I.C. Carmo, F.F. Silvino, G., Castro, K.J. S.X., Mauro, M.L., Rodrigues, N.U.A., Miranda, M.P. S., Pinto, C.E.F. (2017) Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 15:145-151.

- Casierra-Posada, F., Cortés-Bayona, J.D., Cutler, J. (2017) Effect of iron excess on growth of sisal plants (*Furcraea hexapetala*). *Gesunde Pflanzen*, 69:123-129.
- Chagas, A.P., Dutra, V.F. (2020) *Albizia* in Flora e Funga do Brasil. <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB18067>, em 18/12/2023.
- Chan, C., Liao, Y.Y., Chiou, T.J. (2021) The impact of phosphorus on plant immunity. *Plant and Cell Physiology*, 62:582-589.
- Clemens, S. (2019) Metal ligands in micronutrient acquisition and homeostasis. *Plant, cell & environment*, 42:2902-2912.
- Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212:475-486.
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7:52-54.
- Davila, R.B., Fontes, M.P.F., Pacheco, A.A., Ferreira, M. da S. (2020) Heavy metals in iron ore tailings and floodplain soils affected by the Samarco dam collapse in Brazil. *Science of The Total Environment*, 709:136151.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., Tenzer, S. (2013) Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nature Methods*, 11:167-170.
- Dransfield, S., Widjaja, E.A. (1995) *Plant resources of South-East Asia*. Pudoc, 272p.
- Du, Y.C., Kong, L.J., Ma, C.Y., Zhang, W., Sun, K., Dai, C.C. (2022) Auxin functions downstream of ethylene to regulate iron absorption promoted by *Phomopsis liquidambaris* in *Arachis hypogaea* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42:1879-1892.
- Dutta, S., Mitra, M., Agarwal, P., Mahapatra, K., De, S., Sett, U., Roy, S. (2018) Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. *Plant Signaling & Behavior*, 13:e1460048.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F. (2020) The role of salicylic acid and gibberellin signaling in plant responses to abiotic stress with an emphasis on heavy metals. *Plant Signaling & Behavior*, 15:1777372.

- Feng, Y.W., Komatsu, S., Furukawa, T., Koshihara, T., Kohno, Y. (2008) Proteome analysis of proteins responsive to ambient and elevated ozone in rice seedlings. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 125: 255–265.
- Fu, J., Momčilović, I., Prasad, P.V.V. (2012) Roles of Protein Synthesis Elongation Factor EF-Tu in Heat Tolerance in Plants. *Journal of Botany*, 2012: 835836.
- Gao, F., Dubos, C. (2021) Transcriptional integration of plant responses to iron availability. *Journal of Experimental Botany*, 72: 2056–2070.
- Ghuge, S.A., Nikalje, G.C., Kadam, U.S., Suprasanna, P., Hong, J.C. (2023) Comprehensive mechanisms of heavy metal toxicity in plants, detoxification, and remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 450: 131039.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D. (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 94: 615–623.
- Goepfert, S., Poirier, Y. (2007) β -Oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 245-251.
- Guo, Z., Zeng, P., Xiao, X., Peng, C. (2021) Physiological, anatomical, and transcriptional responses of mulberry (*Morus alba* L.) to Cd stress in contaminated soil. *Environmental Pollution*, 284:117387.
- Han, X., Kui, M., He, K., Yang, M., Du, J., Jiang, Y., Hu, Y. (2022) Jasmonate-regulated root growth inhibition and root hair elongation. *Journal of Experimental Botany*, 74:1176-1185.
- Hänsch, R., Mendel, R.R. (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12:259-266.
- Hu, J., Rampitsch, C., Bykova, N. V. (2015) Advances in plant proteomics toward improvement of crop productivity and stress resistance. *Frontiers in Plant Science*, 6:209.
- Hu, Y.F., Zhou, G., Na, X.F., Yang, L., Nan, W. Bin., Liu, X., Zhang, Y.Q., Li, J.L., Bi, Y.R. (2013) Cadmium interferes with maintenance of auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 170:965-975.
- Hyun, S.C., Kieber, J.J. (2005) Eto brute? role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 10:291-296.

- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (2015) *Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais*. Brasília, 3p.
- Jackson, M.L. (1965) *Soil chemical analysis: advanced course*. UW-Madison Libraries parallel press, 498p.
- Jansson, S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 4:236-240.
- Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z., Shabala, S. (2015) Salicylic acid in plant salinity stress signalling and tolerance. *Plant Growth Regulation*, 76: 25-40.
- Jucoski, G.O., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliveira, J.A. (2016) Excesso de ferro sobre o crescimento e a composição mineral em *Eugenia uniflora* L. *Revista Ciência Agronômica*, 47:720-728.
- Kerry, R.G., Mahapatra, G.P., Patra, S., Sahoo, S.L., Pradhan, C., Padhi, B.K., Rout, J.R. (2018) Proteomic and genomic responses of plants to nutritional stress. *BioMetals*, 31:161-187.
- Khalil, R., Haroun, S., Bassyoini, F., Nagah, A., Yusuf, M. (2021) Salicylic acid in combination with kinetin or calcium ameliorates heavy metal stress in *Phaseolus vulgaris* plant. *Journal of Agriculture and Food Research*, 5:100182.
- Khan, F., Siddique, A.B., Shabala, S., Zhou, M., Zhao, C. (2023) Phosphorus plays key roles in regulating plants' physiological responses to abiotic stresses. *Plants*, 12:2861.
- Kim, S.A., Guerinot, M. Lou. (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters*, 581:2273-2280.
- Kobayashi, T., Nozoye, T., Nishizawa, N.K. (2019) Iron transport and its regulation in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 133:11-20.
- Krohling, C.A., Eutrópico, F.J., Bertolazi, A.A., Dobbss, L.B., Campostrini, E., Dias, T., Ramos, A.C. (2016) Ecophysiology of iron homeostasis in plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62:39-47.
- Kuinchtner, C.C., Oliveira, G.S.W., Aguilar, M.V.M.A., Bernardy, D., Berger, M., Tabaldi, L.A. (2021) Can species *Cedrela fissilis* Vell. be used in sites contaminated with toxic aluminum and cadmium metals? *iForest-Biogeosciences & Forestry*, 14:508-516.

- Kumar, A., Dubey, A.K., Kumar, V., Ansari, M.A., Narayan, S., Meenakshi., Kumar, S., Pandey, V., Shirke, P.A., Pande, V., Sanyal, I. (2020) Over-expression of chickpea glutaredoxin (CaGrx) provides tolerance to heavy metals by reducing metal accumulation and improved physiological and antioxidant defence system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192:110252.
- Kurepa, J., Smalle, J.A. (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie*, 90:324-335.
- Lapaz, A. de M., de Camargos, L.S., Yoshida, C.H.P., Firmino, A.C., de Figueiredo, P.A.M., Aguilar, J.V., Nicolai, A.B., Silva de Paiva, W. da., Cruz, V.H., Tomaz, R.S. (2020) Response of soybean to soil waterlogging associated with iron excess in the reproductive stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26:1635-1648.
- Lapaz, A. de M., Yoshida, C.H.P., Gorni, P.H., de Freitas-Silva, L., Araújo, T. de O., Ribeiro, C. (2022) Iron toxicity: effects on the plants and detoxification strategies. *Acta Botanica Brasilica*, 36: e2021abb0131.
- Lei, G.J., Sun, L., Sun, Y., Zhu, X.F., Li, G.X., Zheng, S.J. (2020) Jasmonic acid alleviates cadmium toxicity in *Arabidopsis* via suppression of cadmium uptake and translocation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62:218-227.
- Li, G., Xu, W., Kronzucker, H.J., Shi, W. (2015) Ethylene is critical to the maintenance of primary root growth and Fe homeostasis under Fe stress in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66:2041-2054.
- Li, X., Cai, C., Wang, Z., Fan, B., Zhu, C., Chena, Z. (2018) Plastid translation elongation factor Tu is prone to heat-induced aggregation despite its critical role in plant heat tolerance. *Plant Physiology*, 176:3027.
- Li, Y., Zhang, S., Bao, Q., Chu, Y., Sun, H., Huang, Y. (2022) Jasmonic acid alleviates cadmium toxicity through regulating the antioxidant response and enhancing the chelation of cadmium in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Pollution*, 304:119178.
- Liang, M., Gu, D., Lie, Z., Yang, Y., Lu, L., Dai, G., Peng, T., Deng, L., Zheng, F., Liu, X. (2023) Regulation of chlorophyll biosynthesis by light-dependent acetylation of NADPH: protochlorophyll oxidoreductase A in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 330:111641.

- Liu, R., Zhang, H., Lal, R. (2016a) Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on Lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients? *Water, Air, & Soil Pollution*, 227: 42.
- Liu, T., Arsenault, J., Vierling, E., Kim, M. (2021) Mitochondrial ATP synthase subunit d, a component of the peripheral stalk, is essential for growth and heat stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 107:713-726.
- Liu, X., Shen, X., Lai, Y., Ji, K., Sun, H., Wang, Y., Hou, C., Zou, N., Wan, J., Yu, J. (2016b) Toxicological proteomic responses of halophyte *Suaeda salsa* to lead and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134:163-171.
- Majerus, V., Bertin, P., Lutts, S. (2009) Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. *Plant and Soil*, 324:253-265.
- Majerus, V., Bertin, P., Lutts, S. (2007) Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentrations in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). *Plant Science*, 173:96-105.
- Mathur, P., Tripathi, D.K., Baluška, F., Mukherjee, S. (2022) Auxin-mediated molecular mechanisms of heavy metal and metalloids stress regulation in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 196:104796.
- Mitra, S., Subba, S. (2022) Alleviative effects of ferrous sulfate on arsenic toxicity in *Lens culinaris* Medik. by enhancing iron plaque formation on roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44:1–13.
- Mohsenzadeh, S., Esmaili, M., Moosavi, F., Shahrtash, M., Saffari, B., Mohabatkar, H. (2011) Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. *African Journal of Biotechnology*, 10:8160-8165.
- Momcilovic, I., Ristic, Z. (2007) Expression of chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, in two lines of maize with contrasting tolerance to heat stress during early stages of plant development. *Journal of Plant Physiology*, 164:90-99.
- Mukhopadhyay, S., Mastro, R.E. (2022) Comparative evaluation of *Cassia siamea* and *Albizia lebbek* for their potential to recover carbon and nutrient stocks in a chronosequence post-mining site. *Catena* 208: 105726.

- Müller, C., Kuki, K.N., Pinheiro, D.T., de Souza, L.R., Siqueira Silva, A.I., Loureiro, M.E., Oliva, M.A., Almeida, A.M. (2015) Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. *Plant Soil*, 391:123-138.
- Müller, C., Silveira, S.F. S., Daloso, D. M., Mendes, G.C., Merchant, A., Kuki, K.N., Oliva, M.A., Loureiro, M.E., Almeida, A.M. (2017) Ecophysiological responses to excess iron in lowland and upland rice cultivars. *Chemosphere*, 189:123-133.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403:853-858.
- Nanda, R., Agrawal, V. (2016) Elucidation of zinc and copper induced oxidative stress, DNA damage and activation of defence system during seed germination in *Cassia angustifolia* Vahl. *Environmental and Experimental Botany*, 125:31-41.
- Nanjo, Y., Skultety, L., Uváčková, L., Klubicová, K., Hajduch, M., Komatsu, S. (2012) Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *Journal of Proteome Research*, 11:372-385.
- Naveed, M., Ghaffar, M., Khan, Z., Gul, N., Ijaz, I., Bibi, A., Pervaiz, S., Alharby, H.F., Tariq, M.S., Ahmed, S.R., Hakeem, K.R., Tan, D.K.Y. (2023) Morphological and Structural responses of *Albizia lebbek* to different lead and nickel stress levels. *Agriculture*, 13: 1302.
- Nouri, M.Z., Komatsu, S. (2013) Subcellular protein overexpression to develop abiotic stress tolerant plants. *Frontiers in Plant Science*, 4:2.
- Pan, J., Wang, H., You, Q., Cao, R., Sun, G., Yu, D. (2022) Jasmonate-regulated seed germination and crosstalk with other phytohormones. *Journal of Experimental Botany*, 74:1162-1175.
- Passaia, G., Spagnolo Fonini, L., Caverzan, A., Jardim-Messeder, D., Christoff, A.P., Gaeta, M.L., de Araujo Mariath, J.E., Margis, R., Margis-Pinheiro, M. (2013) The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H₂O₂ homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Science*, 208:93-101.
- Pereira, E.G., Oliva, M.A., Rosado-Souza, L., Mendes, G.C., Colares, D.S., Stopato, C.H., Almeida, A.M. (2013) Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Science*, 201:81-92.

- Perveen, S., Anis, M., Aref, I.M. (2012) In vitro morphogenic response and metal accumulation in *Albizia lebbek* (L.) cultures grown under metal stress. *European Journal of Forest Research*, 131: 669–681.
- Peters, J.B. (2005) *Wisconsin procedures for soil testing, plant analysis and feed & forage analysis: plant analysis*. Department of Soil Science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin-Extension, Madison. <https://datcp.wi.gov/Documents/NMProcedures.pdf>, em 15/10/2023.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P. (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39:1008-1018.
- Pinto, S. S., Souza, A.E., Oliva, M.A., Pereira, E.G. (2016) Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. *Scientia Agricola*, 73:217-226.
- Queiroz, H.M., Nóbrega, G.N., Ferreira, T.O., Almeida, L.S., Romero, T.B., Santaella, S.T., Bernardino, A.F., Otero, X.L. (2018) The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? *Science of The Total Environment*, 637:498-506.
- Ranjan, A., Sinha, R., Lal, S.K., Bishi, S.K., Singh, A.K. (2021) Phytohormone signalling and cross-talk to alleviate aluminium toxicity in plants. *Plant Cell Reports*, 40:1331-1343.
- Ravanbakhsh, M., Kowalchuk, G.A., Jousset, A. (2019) Optimization of plant hormonal balance by microorganisms prevents plant heavy metal accumulation. *Journal of Hazardous Materials*, 379:120787.
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J.F., Gaymard, F., Cellier, F. (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 57:400-412.
- Reis, R.S., Vale, E.M., Sousa, K.R., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2021) Pretreatment free of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid improves the differentiation of sugarcane somatic embryos by affecting the hormonal balance and the accumulation of reserves. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 145:101-115.
- Santos, T.R.S., Santos, J.A.S., Pereira, E.G., Garcia, Q.S. (2022) Revegetation of an area impacted by iron ore tailings: evaluating fertilization alternatives in

- native pioneer and secondary trees. *Environmental Science and Pollution Research*, 30:3760-3773.
- Schellingen, K., Van Der Straeten, D., Vandenbussche, F., Prinsen, E., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2014) Cadmium-induced ethylene production and responses in *Arabidopsis thaliana* rely on ACS2 and ACS6 gene expression. *BMC Plant Biology*, 14:1-14.
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G.Ú.L., dos Reis Pedreira Filho, W., Barbosa, F., Cerchiaro, G., Silva, F.F., Batista, B.L. (2016) Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, 218:813-825.
- Seneviratne, M., Rajakaruna, N., Rizwan, M., Madawala, H.M.S.P., Ok, Y.S., Vithanage, M. (2019) Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. *Environmental Geochemistry and Health*, 41:1813-1831.
- Shah, T.R., Misra, A. (2011) Proteomics. *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*, 387-427.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., Mimura, T. (2016) Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant, Cell & Environment*, 39:1112-1126.
- Silue, B.K., Kone, A.W., Masse, D., Moulin-Esmard, P., Kotaix, A.J.A., Chapuis-Lardy, L. (2024) Contrasted effects of shade tree legumes on soil organic carbon stock and carbon balance in 20-year cacao agroforestry, Ivory Coast. *Geoderma Regional*, 37: e00807.
- Silva, B. V., Oliveira, T. D. R., Aragão, V. P. M., Carvalho, A. J. C., Freitas, M. S. M., Silveira, V., Ramos, A. C., Santa-Catarina, C. (2023) Iron (II) sulfate and pH decrease seed germination and seedling growth and alter nutrient and polyamine contents in *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 46.2: 281-292.
- Silveira, V., Balbuena, T.S., Santa-Catarina, C., Floh, E.I.S., Guerra, M.P., Handro, W. (2004) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regulation*, 44:147-156.
- Silveira, V.C., De Oliveira, A.P., Sperotto, R.A., Espindola, L.S., Amaral, L., Dias, J.F., Da Cunha, J.B., Fett, J.P. (2007) Influence of iron on mineral status of two

- rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19:127-139.
- Singh, A.N., Raghubanshi, A.S., Singh, J.S. (2004) Comparative performance and restoration potential of two *Albizia* species planted on mine spoil in a dry tropical region, India. *Ecological Engineering*, 22: 123–140.
- Siqueira-Silva, A.I., Silva, L.C. da., Azevedo, A.A., Oliva, M.A. (2012) Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78:265-275.
- Sun, P., Tian, Q.Y., Chen, J., Zhang, W.H. (2010) Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, 61:347-356.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C. (2021) The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49: D605-D612.
- Tadaiesky, L.B.A., da Silva, B.R.S., Batista, B.L., Lobato, A.K. da S. (2021) Brassinosteroids trigger tolerance to iron toxicity in rice. *Physiologia Plantarum*, 171:371-387.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I., Murphy, A. (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 414p.
- Thole, J.M., Beisner, E.R., Liu, J., Venkova, S. V., Strader, L.C. (2014) Abscisic acid regulates root elongation through the activities of auxin and ethylene in *Arabidopsis thaliana*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4:1259-1274.
- Tisarum, R., Rika, R., Pipatsitee, P., Sotesaritkul, T., Samphumphuang, T., Cha-um, K., Cha-um, S. (2023) Iron (Fe) toxicity, uptake, translocation, and physio-morphological responses in *Catharanthus roseus*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 29:1289-1299.
- Tomaz, T., Bagard, M., Pracharoenwattana, I., Lindén, P., Lee, C.P., Carroll, A.J., Ströher, E., Smith, S.M., Gardeström, P., Millar, A.H. (2010) Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154:1143-1157.

- Tomko, R.J., Hochstrasser, M. (2013) Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 82:415-445.
- Trindade, B.M.C., Reis, R.S., Vale, E.M., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2018) Proteomics analysis of the germinating seeds of *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (Meliaceae): an endangered species of the Brazilian Atlantic Rainforest. *Revista Brasileira de Botânica*, 41:117-128.
- Varotto, C., Maiwald, D., Pesaresi, P., Jahns, P., Salamini, F., Leister, D. (2002) The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 31:589-599.
- Wang, L., Liu, B., Wang, Y., Qin, Y., Zhou, Y., Qian, H. (2020) Influence and interaction of iron and lead on seed germination in upland rice. *Plant Soil*, 455:187-202.
- Wang, R., Wang, J., Zhao, L., Yang, S., Song, Y. (2015) Impact of heavy metal stresses on the growth and auxin homeostasis of *Arabidopsis* seedlings. *Biometals*, 28: 123-132.
- Wu, M., Wu, J., Gan, Y. (2020) The new insight of auxin functions: transition from seed dormancy to germination and floral opening in plants. *Plant Growth Regulation*, 91:169-174.
- Xu, S., Lin, D., Sun, H., Yang, X., Zhang, X. (2015) Excess iron alters the fatty acid composition of chloroplast membrane and decreases the photosynthesis rate: a study in hydroponic pea seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37:1–9.
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S.N., Mohd Yusof, M.L., Ghosh, S., Chen, Z. (2020) Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 11:359.
- Yao, Y., Li, J., He, C., Hu, X., Yin, L., Zhang, Y., Zhang, J., Huang, H., Yang, S., He, H., Zhu, F., Li, S. (2021) Distribution characteristics and relevance of heavy metals in soils and colloids around a mining area in Nanjing, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 107:996-1003.
- Yousaf, M.T. Bin., Nawaz, M.F., Khawaja, H.F., Gul, S., Ali, S., Ahmad, I., Rasul, F., Rizwan, M. (2019) Ecophysiological response of early stage *Albizia lebbek* to cadmium toxicity and biochar addition. *Arabian Journal of Geosciences* 12: 1-8.

- Yruela, I. (2005) Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17:145-156.
- Yuan, H.M., Xu, H.H., Liu, W.C., Lu, Y.T. (2013) Copper regulates primary root elongation through PIN1-Mediated auxin redistribution. *Plant and Cell Physiology*, 54:766-778.
- Yuan, M., Zhang, D.W., Zhang, Z.W., Chen, Y.E., Yuan, S., Guo, Y.R., Lin, H.H. (2012) Assembly of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase complex is needed for effective greening of barley seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 169:1311-1316.
- Yuan, S., Lin, H.H. (2008) Minireview: role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63:313-320.
- Zhang, H., Xu, Z., Guo, K., Huo, Y., He, G., Sun, H., Guan, Y., Xu, N., Yang, W., Sun, G. (2020) Toxic effects of heavy metal Cd and Zn on chlorophyll, carotenoid metabolism and photosynthetic function in tobacco leaves revealed by physiological and proteomics analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202:110856.
- Zhang, X., Xue, C., Wang, R., Shen, R., Lan, P. (2022) Physiological and proteomic dissection of the rice roots in response to iron deficiency and excess. *Journal of Proteomics*, 267:104689.
- Zhao, S., Gao, H., Luo, J., Wang, H., Dong, Q., Wang, Y., Yang, K., Mao, K., Ma, F. (2020) Genome-wide analysis of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding gene family in apple (*Malus domestica*) and functional characterization of MdLhcb4.3, which confers tolerance to drought and osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154:517-529.
- Zhao, S., Ma, Q., Xu, X., Li, G., Hao, L. (2016) Tomato jasmonic acid-deficient mutant spr2 seedling response to cadmium stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35:603-610.
- Zwanenburg, B., Blanco-Ania, D. (2018) Strigolactones: new plant hormones in the spotlight. *Journal of Experimental Botany*, 69:2205-2218.

APÊNDICE

Tabela Suplementar 1: Lista completa de todas as proteínas identificadas em plântulas de *Albizia lebeck*, comparando as concentrações de 4/0 mM, 24/0 mM e 24/4 mM de sulfato de ferro (II) após 12 dias de incubação

Acesso	Descrição	Peptídeos reportados	Acumulação diferencial		
			4/0 mM	24/0 mM	24/4 mM
A0A444ZTF5	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DLN8	(S)-2-hydroxy-acid oxidase	9	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444Y2I8	(S)-2-hydroxy-acid oxidase	8	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445D9X7	14_3_3 domain-containing protein	7	-	Unique_24	Unique_24
A0A445BTG1	14_3_3 domain-containing protein	8	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445E060	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444WWZ3	26S proteasome regulatory subunit RPN11	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XVM3	30S ribosomal protein S8, chloroplastic	7	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DIP1	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445AWT5	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
U3MF97	40S ribosomal protein S23	2	UNCHANGED	-	-
A0A445BWB6	40S ribosomal protein S27	3	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
A0A444XRT3	40S ribosomal protein S4	2	UNCHANGED	-	-
A0A444ZWP4	40S ribosomal protein S6	3	UNCHANGED	Unique_0	Unqieue_4
A0A445BN79	40S ribosomal protein S8	4	UNCHANGED	-	-
A0A444ZR08	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445B1R3	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	14	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YQY9	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	16	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CX18	60S acidic ribosomal protein P0	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A0A6ZDS7	60s ribosomal protein L1	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BK83	60S ribosomal protein L11	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN

A0A445E4L8	60S ribosomal protein L12	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445B2A8	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	18	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445ESM3	AAA domain-containing protein	8	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DL53	AAA domain-containing protein	2	UNCHANGED	UP	UP
A0A445CC17	AAA domain-containing protein	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XKS2	AAA domain-containing protein	7	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444Y8V2	ABC transporter domain-containing protein	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445A4W1	Acetohydroxy-acid reductoisomerase	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445E1C3	Aconitate hydratase	21	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BWU3	Aconitate hydratase	21	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444WUR2	Aconitate hydratase	9	UNCHANGED	UP	UP
A0A445CL48	Actin	21	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BAE6	Actin	20	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445B5I3	Actin	21	UNCHANGED	UP	UP
A0A445EAM5	Acyl-coenzyme A oxidase 4, peroxisomal	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444Z8U1	Adenine phosphoribosyltransferase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445E7D6	Adenosine kinase	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YNG0	Adenosine kinase	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444ZRU7	Adenosylhomocysteinase	16	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZBS6	Adenosylhomocysteinase	17	UNCHANGED	UP	UP
A0A444Y648	ADP/ATP translocase	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BVQ0	ADP/ATP translocase	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XYS5	ADP/ATP translocase	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XIH0	ADP-ribosylation factor	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZX92	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2 homolog 1, mitochondrial	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN

A0A445ECE6	Alcohol dehydrogenase	6	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444X5G0	Alcohol dehydrogenase	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445EPG6	Aldedh domain-containing protein	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445ENB5	Aldedh domain-containing protein	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DW96	Aldedh domain-containing protein	8	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DPG9	Aldedh domain-containing protein	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445D2E3	Aldedh domain-containing protein	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AU11	Aldedh domain-containing protein	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445E311	Aldo_ket_red domain-containing protein	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444WNT6	Aldo_ket_red domain-containing protein	4	UNCHANGED	UP	UP
A0A445DNP8	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444X8G9	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YS36	Alpha-mannosidase	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XUU0	Alpha-xylosidase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DJP1	Aminomethyltransferase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A445CA44	Aminotran_1_2 domain-containing protein	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445D7T0	Aminotransferase class I/classII domain-containing protein	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DYJ7	ANK_REP_REGION domain-containing protein	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445BZQ7	Annexin	3	UNCHANGED	UP	UP
A0A444XAD2	Annexin	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A445B4C1	Aspartate aminotransferase	9	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444YV53	Aspartate aminotransferase	10	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DNJ6	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445ELZ7	ATP citrate synthase	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445ED48	ATP synthase subunit alpha	11	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445A0G3	ATP synthase subunit alpha	9	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED

A0A445DC02	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XW77	ATP synthase subunit beta	19	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CFQ1	ATP-dependent RNA helicase	13	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AUN1	ATP-dependent RNA helicase	10	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AI22	ATPase F1/V1/A1 complex alpha/beta subunit nucleotide-binding domain-containing protein	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445B598	ATPase F1/V1/A1 complex alpha/beta subunit N-terminal domain-containing protein	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZZV5	Biotin carboxylase	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444X4D8	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444X1A7	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	7	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444ZYA1	Calnexin	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445BKU9	Calreticulin	12	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DPL3	Carbonic anhydrase	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CCX1	Catalase	9	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BRP0	Catalase	8	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YE95	CCT-eta	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445B112	CCT-theta	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445BWH0	Cell division cycle protein 48	15	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AB22	Cell division cycle protein 48	9	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AA41	Cell division cycle protein 48	17	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A444XRR8	Chaperonin CPN60-2	17	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445BGZ8	Chaperonin CPN60-2	16	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445D4N7	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CYP2	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	9	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445C2K4	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	8	UNCHANGED	DOWN	DOWN

A0A445BYE8	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	3	UNCHANGED	-	-
A0A444WZ23	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	4	UNCHANGED	-	-
A0A445C6W9	Clathrin heavy chain	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445C5B9	Clathrin heavy chain	15	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444X3L0	Clathrin heavy chain	17	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445EJN5	Clp R domain-containing protein	4	UNCHANGED	UP	UP
A0A445C1V2	Clp R domain-containing protein	8	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445DQT8	Cysteine synthase	4	UNCHANGED	-	-
A0A444ZMJ2	Cysteine synthase	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444Z7K3	Cysteine synthase	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CRL7	Cytochrome P450 98A2	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AV11	CYTOSOL_AP domain-containing protein	8	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444XV99	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	11	UNCHANGED	UP	UP
A0A445EIN4	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445BSX3	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	2	UNCHANGED	-	-
A0A445BRG5	Delta-tubulin	18	Unique_4	-	Unqieue_4
A0A445D9W9	Diadenosine tetraphosphate synthetase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AW73	Dihydrolipoyl dehydrogenase	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZC16	Dihydroxy-acid dehydratase	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445C193	DJ-1/PfpI domain-containing protein	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BAR6	DNA polymerase V	13	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445A8R7	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	3	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445BPH1	EF1_GNE domain-containing protein	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445A9D0	EF1_GNE domain-containing protein	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445BF59	EGF-like domain-containing protein	2	UNCHANGED	UP	UP

A0A445BVU6	Elongation factor 1-alpha	14	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445BD10	Elongation factor 1-alpha	19	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
A0A445ADV8	Elongation factor 1-gamma	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CKV5	Elongation factor Tu	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445ATT0	Elongation factor Tu	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445AB33	Elongation factor Tu	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YY10	Enoyl reductase (ER) domain-containing protein	2	UNCHANGED	-	-
A0A445BSN0	Enoyl reductase (ER) domain-containing protein	14	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
D8KXZ7	Enoyl-ACP reductase 1-2	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CNY6	Epimerase domain-containing protein	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444Y7T3	Epimerase domain-containing protein	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444Y8P8	Eukaryotic initiation factor 4A-8 isoform X1	14	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AZP6	Eukaryotic translation initiation factor 5A	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444WUG6	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZFB8	Fibronectin type III-like domain-containing protein	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444Z225	Formate dehydrogenase, mitochondrial	2	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
T2B9M0	Fructose-bisphosphate aldolase	14	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CQ94	Fructose-bisphosphate aldolase	14	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445A8G8	Fructose-bisphosphate aldolase	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444XV97	Fructose-bisphosphate aldolase	9	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445EM30	Galactokinase	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CNJ4	Glucose and ribitol dehydrogenase	6	UNCHANGED	UP	UP
A0A445ELL8	Glucose and ribitol dehydrogenase	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A445B3H6	Glucose-6-phosphate isomerase	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZVX7	Glutamate decarboxylase	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CSV5	Glutamate dehydrogenase	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED

A0A445E3R9	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZU75	Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DTP6	Glutathione peroxidase	2	UNCHANGED	UP	UP
A0A444Y2J0	Glutathione S-transferase	4	UNCHANGED	UP	UP
A0A445DWQ9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	14	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CUC5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A445B9L1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	13	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CXA1	Glycine cleavage system P protein	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DY22	Glyoxalase I	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445AXK1	Glyoxalase I	4	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A445AU23	Gp_dh_C domain-containing protein	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YRR3	Gp_dh_N domain-containing protein	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444XYE0	GTP-binding nuclear protein	10	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AWM0	GTP-binding protein	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DRV6	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	8	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DN91	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	9	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AVY7	H(+)-exporting diphosphatase	4	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A445BUJ9	H(+)-transporting two-sector ATPase	17	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DVJ9	H(+)-transporting two-sector ATPase	12	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DTY4	HATPase_c domain-containing protein	10	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CZP0	HATPase_c domain-containing protein	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BRF2	HATPase_c domain-containing protein	15	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AND8	HATPase_c domain-containing protein	28	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445AF96	HATPase_c domain-containing protein	7	UNCHANGED	UP	UP
A0A444YFL6	HATPase_c domain-containing protein	24	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444XCH2	Heat shock 70 kDa protein	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN

A0A445CIR4	Heat shock 70 kDa protein	17	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444WXS0	Heat shock 70 kDa protein	10	UNCHANGED	UP	UP
A0A445ENG6	Heat shock 70 kDa protein	21	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DA98	Heat shock cognate 70 kDa protein	20	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DA96	Heat shock cognate 70 kDa protein	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445A9Y6	Heat shock cognate 70 kDa protein	20	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444YMH6	Heat shock cognate 70 kDa protein	18	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445D9X3	HGTP_ anticodon domain-containing protein	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445EDU9	Histone H4	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445BSJ6	Importin N-terminal domain-containing protein	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZFB4	Importin subunit alpha	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YCA5	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	8	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445E0V5	Isocitrate lyase	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445D9V5	Isocitrate lyase	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DWK8	KH type-2 domain-containing protein	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DJL0	Lactoylglutathione lyase	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BRN9	L-ascorbate oxidase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A1Z1T1	L-ascorbate peroxidase	4	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445E402	Lipoxygenase	4	UNCHANGED	-	-
A0A445BMH5	Lipoxygenase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444YK29	Lipoxygenase	2	UNCHANGED	UP	UP
A0A445DV66	Luminal-binding protein	19	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XKK1	M16C_ associated domain-containing protein	2	UNCHANGED	UP	UP
A0A445DRP9	Malate dehydrogenase	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BI82	Malate dehydrogenase	14	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BI73	Malate dehydrogenase	13	UNCHANGED	DOWN	DOWN

A0A445AZS1	Malate dehydrogenase	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445AD99	Malate dehydrogenase	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445A3S6	Malate dehydrogenase	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445ATH7	Malate synthase	8	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A445DXV8	Malic enzyme	8	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445D2U1	Malic enzyme	9	Unique 0	Unique 0	-
A0A445C8P8	Malic enzyme	10	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A444YZP5	Malic enzyme	14	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BU55	Malic enzyme	9	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444XBQ4	Mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate transporter DTC	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YS80	Mitochondrial phosphate carrier protein	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445A372	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YQD3	NAC-A/B domain-containing protein	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444Y881	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DRP4	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445E2F5	NAD-dependent epimerase/dehydratase domain-containing protein	3	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445DAH2	NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444WNH1	NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein	10	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DYM5	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BZ81	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BR63	NmrA domain-containing protein	3	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
Q45W80	Nucleoside diphosphate kinase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445D6G7	Nucleoside diphosphate kinase	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DL13	Nudix hydrolase domain-containing protein	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED

A0A445C6A3	Nudix hydrolase domain-containing protein	5	-	Unique_24	Unique_24
A0A444YCF8	Nudix hydrolase domain-containing protein	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444ZSD1	Ornithine aminotransferase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445ANU8	Oxygen-evolving enhancer protein 1	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444XM09	PALP domain-containing protein	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DJV5	PAP fibrillin domain-containing protein	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445E765	Pectinesterase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A445AD05	Pectinesterase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444ZW17	Peptidase_M3 domain-containing protein	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445EWZ1	Peptidase_S9 domain-containing protein	2	UNCHANGED	-	-
A0A445BCL3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	6	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
A0A0A6ZDN9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AQW6	Peroxidase	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445C634	PfkB domain-containing protein	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444Y8R8	PfkB domain-containing protein	8	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DBX7	PHB domain-containing protein	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445C3A3	Phosphatidate cytidyltransferase	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445C8X3	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	5	UNCHANGED	UP	UP
A0A444WVT0	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444Z2W0	Phosphoglucomutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent)	11	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445EUB0	Phosphogluconate dehydrogenase (NADP(+)-dependent, decarboxylating)	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444ZGF7	Phosphogluconate dehydrogenase (NADP(+)-dependent, decarboxylating)	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CEK0	Phosphoglycerate kinase	9	UNCHANGED	DOWN	DOWN

A0A445CEI5	Phosphoglycerate kinase	15	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZLA4	Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-independent)	10	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CIL2	Phospholipase D	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CQ67	Phosphopyruvate hydratase	21	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444YY24	Phosphopyruvate hydratase	21	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444WVJ5	Phosphoribulokinase	4	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444WUY4	Phosphoserine aminotransferase	2	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A445BUL7	Photosystem I	5	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A445EUW8	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	10	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A444WQ31	Photosystem II CP43 reaction center protein	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XJD8	Photosystem II CP47 reaction center protein	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444WQJ4	Photosystem II CP47 reaction center protein	2	UNCHANGED	Unique_T0	Unqiue_4
A0A445C618	Photosystem II D2 protein	3	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A445D9F8	Photosystem II D2 protein	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AGZ0	Photosystem II protein D1	5	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A445BSX1	Photosystem II protein D1	3	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A444ZV87	PKS_ER domain-containing protein	3	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A445D2Z0	Profilin	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445C227	Proteasome endopeptidase complex	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BZB0	Proteasome subunit alpha type	5	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444ZK37	Proteasome subunit alpha type	9	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444YWT8	Proteasome subunit alpha type	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XVP4	Proteasome subunit alpha type	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445E9A2	Proteasome subunit beta	4	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A445DUK2	Proteasome subunit beta	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445D0T6	Proteasome subunit beta	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN

A0A445CNU0	Proteasome subunit beta	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445B427	Proteasome subunit beta	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YZM6	Proteasome subunit beta	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CH21	PROTEASOME_ALPHA_1 domain-containing protein	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XVB0	Putative cinnamyl alcohol dehydrogenase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XQQ0	Putative plastid-lipid-associated protein 6	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445E7N6	Pyr_redox_2 domain-containing protein	7	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A444XAW9	Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DF95	Pyruvate decarboxylase	3	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
A0A444ZM98	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445E771	Pyruvate kinase	10	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445E0Z9	Pyruvate kinase	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DHF2	Pyruvate kinase	3	UNCHANGED	Unique_T0	Unqieue_4
A0A445D3V5	Pyruvate kinase	12	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444XSI4	Pyruvate kinase	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DJU1	Ras-related protein	3	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445CIB8	Ras-related protein	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YMM7	Ras-related protein	3	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444XDL8	Ras-related protein	3	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445E3M6	Ras-related protein Rab7	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DT66	Ribonuclease	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XKM9	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	2	UNCHANGED	-	-
A0A444Z989	Ribosomal_L2_C domain-containing protein	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CS98	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	2	UNCHANGED	UP	UP
A0A445E5B5	Ribosomal_S7 domain-containing protein	9	UNCHANGED	DOWN	DOWN

A0A445EX07	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	21	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445B7R8	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	6	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A445BJK2	Ribulose bisphosphate carboxylase large subunit C-terminal domain-containing protein	12	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444X9E3	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DQJ5	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	10	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445AJD1	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	8	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YCV3	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	9	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZW91	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	8	-	Unique_24	Unique_24
A0A445CM38	RING-type E3 ubiquitin transferase	5	-	Unique_0	-
A0A445E4X3	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	20	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444Y2P1	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta	21	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445EET8	RuBisCO large domain-containing protein	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445AFM7	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444YMB1	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	4	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444YF48	S-adenosylmethionine synthase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AAR7	Selenium-binding protein	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444ZVK9	Serine hydroxymethyltransferase	2	UNCHANGED	-	-
A0A444ZRW6	Serine hydroxymethyltransferase	11	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444Z7M9	Small ribosomal subunit protein eS1	5	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444ZC42	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	21	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444ZBN3	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	8	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED

A0A444WS14	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445D3X6	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445CEU3	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445EPP4	Sucrose synthase	14	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445CMJ0	Sucrose synthase	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445A116	Sucrose synthase	13	UNCHANGED	DOWN	DOWN
Q1HDS7	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	2	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A445DAI2	SWIM-type domain-containing protein	13	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DNF4	T-complex protein 1 subunit delta	2	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445D4M0	T-complex protein 1 subunit gamma	2	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A445BKM6	TCTP domain-containing protein	2	UNCHANGED	-	-
A0A445D891	Thiamine thiazole synthase, chloroplastic	3	UNCHANGED	Unique_0	Unqiue_4
A0A444WWG8	Thioredoxin reductase	2	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A444YPV6	Thioredoxin-dependent peroxiredoxin	5	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445D9V9	Transaldolase	7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445E6W9	Transketolase	5	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444XUY6	Transketolase	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A444YNV1	Triosephosphate isomerase	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444Y8D3	Triosephosphate isomerase	5	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445AY07	Tropinone reductase-like 3	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445A9A5	Tr-type G domain-containing protein	14	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444Y035	Tr-type G domain-containing protein	21	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445BU13	Tubulin alpha chain	17	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445BF91	Tubulin alpha chain	16	UP	Unique_0	Unqiue_4
A0A445B1L4	Tubulin alpha chain	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN

A0A444YRD7	Tubulin alpha chain	12	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444XB67	Tubulin alpha chain	16	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CZ80	Tubulin beta chain	20	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445CCR6	Tubulin beta chain	20	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445AJN6	Tubulin beta chain	22	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A444ZZ51	Tubulin beta chain	13	UNCHANGED	Unique 0	Unqiue 4
A0A444ZDX1	Tubulin beta chain	22	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AMD4	UBC core domain-containing protein	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
Q45W77	Ubiquitin-conjugating enzyme 1	2	UNCHANGED	-	-
A0A444Y0B6	Ubiquitin-like domain-containing protein	6	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445DB36	UDP-arabinopyranose mutase	3	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445D5H5	UDP-arabinopyranose mutase	13	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445B3V0	UDP-arabinopyranose mutase	2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DBF2	UDP-glucose 6-dehydrogenase	7	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445B2V7	UDP-glucose 6-dehydrogenase	8	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445A9L1	UDP-glucuronate decarboxylase	8	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A444ZVQ6	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	5	UP	UP	UNCHANGED
A0A444ZY94	UVR domain-containing protein	6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445DCB6	Vacuolar proton pump subunit B	17	UNCHANGED	UP	UP
A0A445DL01	V-type proton ATPase catalytic subunit A	17	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A445EWW7	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A444Z0T8	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	8	UNCHANGED	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A445AV38	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	2	-	-	UNCHANGED
A0A445ENE7	Xylose isomerase	3	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A445DUP5	Xylose isomerase	4	UNCHANGED	DOWN	DOWN

As proteínas foram consideradas como *up*-acumuladas se o valor \log_2 *fold change* (FC) fosse maior que 0,6 e *down*-acumuladas se o valor \log_2 FC fosse menor que -0,6, conforme determinado pelo teste t de Student (bilateral; $P < 0,05$).