



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

SIDNEY VASCONCELOS DO NASCIMENTO

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DE PLANTAS UTILIZADAS NA
RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS NA SERRA DOS
CARAJÁS.**

Trabalho submetido ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Guilherme Corrêa de Oliveira
Co-orientador: Rafael Borges da Silva Valadares

**Belém-Pará
Agosto de 2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N244p Nascimento, Sidney Vasconcelos do.
Proteômica comparativa de plantas utilizadas na recuperação de
áreas degradadas na Serra dos Carajás. / Sidney Vasconcelos do
Nascimento. — 2022.
93 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira
Coorientador(a): Prof. Dr. Rafael Borges da Silva Valadares
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular, Belém, 2022.

1. Proteômica de Plantas. 2. Resposta a estresse. 3.
Mecanismos adaptativos. I. Título.

CDD 572.6

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:

- Universidade Federal do Pará.
- Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS).

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS:

- Vale S. A., projeto “Canga Biodiversity and Ecosystem Services”.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Maria de Belém, minha tia Luiza e ao meu irmão Thiago, pelo apoio, confiança e compreensão durante esses anos de estudos. Agradeço também a minha namorada, Ragyza, por todo o amor, paciência e apoio. O consentimento, incentivo e a confiança deles foram fundamentais para eu continuar com a mesma força de vontade em realizar este sonho nos momentos difíceis atravessados durante essa trajetória.

Ao meu orientador, Guilherme Oliveira, pela oportunidade e confiança. Ao meu co-orientador, Rafael Valadares, pela confiança, parceria e dedicação de sempre. Ao Hector Herrera, que sempre esteve disposto a dedicar um pouco do seu tempo para colaborar conosco, e aos outros alunos e pesquisadores (em especial ao Cecílio Frois, Silvio Ramos e Markus Gastauer), bem como aos técnicos de laboratório do Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS), em Belém do Pará, que colaboraram de alguma forma em etapas cruciais para que esta pesquisa e os manuscritos fossem desenvolvidos.

Agradeço à Universidade Federal do Pará pela oportunidade de realizar o Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Ao ITV-DS pelo financiamento da pesquisa através do projeto “Canga Biodiversity and Ecosystem Services”, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado.

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. CANGA NA SERRA DOS CARAJÁS	8
1.2. RECUPERAÇÃO DE ÁREAS MINERADAS	9
1.3. <i>Dioclea apurensis</i> Kunth (Fabaceae).....	12
1.4. <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> Barneby (Fabaceae)	14
1.5. A EXIGÊNCIA DE ADAPTAÇÕES EM PLANTAS ESTABELECIDAS EM CANGA E EM ÁREAS MINERADAS	15
1.6. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE RESPOSTAS A ESTRESSES EM PLANTAS	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. GERAL	20
2.2. ESPECÍFICOS	20
3. CAPÍTULO I: PERFÍS PROTEICOS REVELAM MECANISMOS ADAPTATIVOS DA ESPÉCIE <i>Dioclea apurensis</i> Kunth ESTABELECIDA EM ÁREAS MINERADAS EM REABILITAÇÃO NA AMAZÔNIA ORIENTAL	21
4. CAPÍTULO II: PROTEÔMICA EM RAÍZES DE <i>Mimosa acutistipula</i> FORNECE INFORMAÇÕES SOBRE MECANISMOS DE RESPOSTA A ESTRESSE EM PLANTAS CRESCIDAS EM MINAS DE FERRO NA AMAZÔNIA ORIENTAL	41
5. REFERÊNCIAS	58
6. ANEXO I: Artigo publicado incluindo dados do capítulo I	75

RESUMO

A extração de minério de ferro na Amazônia oriental ocorre principalmente em afloramentos ferruginosos, conhecidos como canga. As plantas que se desenvolvem nesses ecossistemas estão sujeitas a condições ambientais severas e devem apresentar mecanismos adaptativos para se estabelecerem. Áreas mineradas representam ambientes desafiadores à reabilitação do ecossistema assim como o ambiente natural onde as plantas evoluíram. Espécies da família Fabaceae, como a *Dioclea apurensis* e a *Mimosa acutistipula*, estão entre as mais representativas nesses ambientes. Considerando a importância da diminuição da perda de biodiversidade por meio da revegetação, é essencial a identificação de espécies nativas de alto rendimento nesses ambientes. As espécies *D. apurensis* e *M. acutistipula* são consideradas promissoras por apresentarem altas persistências em áreas mineradas em reabilitação. É esperado que plantas que evoluíram na canga apresentem mecanismos de resposta aos estresses que possibilitam melhor desempenho em projetos de recuperação. Compreender os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas dessas espécies a estímulos ambientais é essencial para deduzir suas capacidades de adaptação diante de possíveis fatores estressantes em áreas mineradas em reabilitação ao longo do tempo. Este estudo teve como objetivo comparar os perfis proteômicos radiculares da *D. apurensis* e *M. acutistipula* crescidas em canga e em áreas mineradas em reabilitação a fim de identificar proteínas essenciais em suas adaptações em canga e que devem apoiar seus estabelecimentos em áreas mineradas. Os grupos de proteínas mais representativas foram relacionados às respostas ao déficit hídrico, ao calor, aos íons metálicos e deficiência de nutrientes, bem como às atividades de biocontrole contra fitopatógenos e simbiose. Os resultados mostraram que em ambas as espécies as proteínas de respostas aos estímulos abióticos e bióticos com abundâncias diferenciais significativas apresentaram maiores níveis em plantas crescidas em canga. Este estudo fornece conhecimento sobre proteínas envolvidas nas respostas da *D. apurensis* e *M. acutistipula* a estímulos ambientais, sugerindo mecanismos críticos para apoiar o estabelecimento de plantas nativas de canga em áreas mineradas em reabilitação.

Palavras-chave: áreas mineradas em reabilitação, proteômica de plantas, mecanismos adaptativos, resposta a estresse

ABSTRACT

The extraction of iron ore in the eastern Amazon occurs mainly in ferruginous outcrops, known as canga. Plants that develop in these ecosystems are subject to severe environmental conditions and must present adaptive mechanisms to establish themselves. Mined areas represent challenging environments for ecosystem rehabilitation. Species of the Fabaceae family such as *Dioclea apurensis* and *Mimosa acutistipula* are among the most representative in these environments. Considering the importance of reducing the loss of biodiversity through revegetation, it is essential to identify high-yielding native species in these environments. The species *D. apurensis* and *M. acutistipula* are considered promising because they present high ranges in rehabilitating minelands. It is expected that plants that evolved in canga have stress response mechanisms that enable better performance in projects to recover mined areas. Understanding the molecular mechanisms involved in the responses of these species to environmental stimuli is essential to deduce their adaptive capacities in the face of possible stressors in rehabilitating minelands over time. This study aimed to compare the root protein profiles of *D. apurensis* and *M. acutistipula* grown in canga and in rehabilitating minelands in order to identify essential proteins in their adaptations in canga and that should support their establishments in mined areas. The most representative protein groups were related to responses to water deficit, heat, metal ions and nutrient deficiency, as well as biocontrol activities against phytopathogens and symbiosis. The results showed that in both species the proteins of responses to abiotic and biotic stimuli with significant differential abundances showed higher levels in plants grown in canga. This study provides insights into proteins involved in the responses of *D. apurensis* and *M. acutistipula* to environmental stimuli, suggesting critical mechanisms to support the establishment of native canga plants in rehabilitating minelands.

Keywords: rehabilitating minelands, plant proteomics, adaptive mechanisms, stress response

1. INTRODUÇÃO

1.1. CANGA NA SERRA DOS CARAJÁS

No Brasil, a extração de minério de ferro ocorre em ambientes caracterizados por severas condições edáficas e climáticas locais, que levaram ao desenvolvimento de uma vegetação típica e altamente diversificada, conhecida como canga (Figura 1) (Ginocchio e Baker, 2004; Jacobi *et al.*, 2007; Nunes, 2009). Ambientes de canga ocorrem principalmente em pequenas áreas do alto relevo do Quadrilátero Ferrífero (Minas Gerais) e na Serra dos Carajás (Pará), onde podem ser encontrados alguns dos maiores reservatórios de ferro do mundo (dos Santos e Milanez, 2015).



Figura 1 - Vegetação de canga ferruginosa na Serra dos Carajás, Pará, Brasil.

Fonte: Zappi 2017.

A Serra dos Carajás é um complexo montanhoso localizado no sudeste do estado do Pará, retratado por sua riqueza natural de recursos minerais. O complexo inclui partes dos municípios de São Felix do Xingu, Ourilândia do Norte, Curionópolis, Eldorado dos Carajás, Parauapebas, Canaã dos Carajás e Água Azul do Norte.

Os solos de canga são compostos por fragmentos ferruginosos de diferentes tamanhos e sua vegetação é denominada na literatura como vegetação de canga, campos ferruginosos ou campos rupestres ferruginosos (Vincent e Meguro, 2008). O solo é formado por substratos rochosos e solos primários que podem provocar algumas restrições que dificultam o desenvolvimento das plantas existentes na região (Zappi *et al.*, 2018).

Os altos níveis de metais pesados como o Fe encontrado no solo prejudicam as adaptações das plantas (Schaefer *et al.*, 2015). A comunidade de plantas que se desenvolve nestes locais está constantemente sujeita a condições adversas, como alto índice de radiação UV e alta temperatura diária (solo e ar) que, combinadas com ventos constantes, aumentam a demanda evapotranspiratória (Skirycz *et al.*, 2014). Em solos de canga, além da baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente o fósforo (5-20 vezes menor), pH ácido (pH ~ 4), altos níveis de metais pesados, especialmente o Fe (20-50 vezes maior), há baixa capacidade de retenção de água, o que tende a agravar os efeitos do déficit hídrico mesmo durante a estação chuvosa (Jacobi *et al.*, 2007; Vincent e Meguro, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Skirycz *et al.*, 2014; Nunes *et al.* 2015). Neste contexto, a vegetação de canga é caracterizada por plantas que possuem capacidade de suportar altas concentrações de metais pesados nos solos, além de apresentarem mecanismos de tolerância para os diversos estresses ambientais que podem ocorrer simultaneamente nesse ecossistema (Skirycz *et al.*, 2014; Zappi *et al.*, 2018). Portanto, plantas neste ambiente podem ter sofrido pressões seletivas severas, resultando em comunidades vegetais com genótipos adaptados.

1.2. RECUPERAÇÃO DE ÁREAS MINERADAS

No Brasil, a forma de mineração mais praticada ocorre a céu aberto na Serra dos Carajás (Gastauer *et al.*, 2019). Após a extração do minério de ferro, essas áreas ficam caracterizadas pela remoção da vegetação e do solo, bem como por apresentarem solos ressecados, compactados e pobres em nutrientes e matéria orgânica, apresentando declives acentuados, altos índices de radiação solar, menor atividade biológica e propriedades físicas alteradas (Boyer e Wratten, 2010; Garriss *et al.*, 2016; Zappi *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2020; Guedes *et al.*, 2021). Dessa forma, a atividade de mineração altera fortemente a paisagem nos locais de extração/processamento, além de gerar resíduos com potencial impacto negativo no meio ambiente.

Esses ambientes impactados são difíceis de restaurar, pois suas características dificultam a colonização pela flora nativa (Skousen e Zipper, 2014; Macdonald *et al.*, 2015; Gastauer *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2020). Assim, distúrbios ambientais estão diretamente associados à perda de biodiversidade. Nesse contexto, a recuperação de áreas degradadas pela mineração se torna cada vez mais necessária para reduzir os efeitos negativos da mineração em ambientes nativos e contribuir para a conservação da biodiversidade de espécies endêmicas.

O termo recuperação vem sendo relacionado diretamente com as áreas degradadas, referindo à aplicação de técnicas para recuperações agrônômicas, biológicas e de engenharia, visando a recomposição topográfica e a revegetação de áreas com poucas possibilidades de se recuperarem naturalmente após a prática da mineração (Zappi *et al.*, 2018). A revegetação de áreas impactadas é uma prática muito utilizada e recomendada para a obtenção de um novo solo (Jianjun *et al.*, 2012; Zappi *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019a). Neste processo, tanto espécies vegetais nativas ou exóticas podem ser utilizadas, porém o reestabelecimento das espécies nativas se constitui na prática ecologicamente mais recomendada (Ramos *et al.*, 2019a) para que o “ecossistema novo” apresente condições desejáveis (Zappi *et al.*, 2018).

Mineradoras que atuam com a biodiversidade precisam produzir pesquisas no intuito de monitorar e preservar as comunidades naturais da flora, fauna e microrganismos presentes nas áreas de mineração e arredores (Skirycz *et al.*, 2014; dos Santos e Milanez, 2015; Gastauer *et al.*, 2019). Assim, pesquisas que priorizam a obtenção de informações para programas de recuperação de áreas degradadas (RAD) se tornam cada vez mais necessárias. Para isso têm sido aplicadas diferentes estratégias a fim de contribuir com a recuperação de áreas impactadas pela mineração de ferro. Inclui-se aqui a adequação das propriedades físicas e químicas do solo, seleção de espécies nativas, controle de espécies invasoras e monitoramento do sucesso da reabilitação (Figura 2) (Gastauer *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019a; Ramos *et al.*, 2019b; Carvalho *et al.*, 2020).

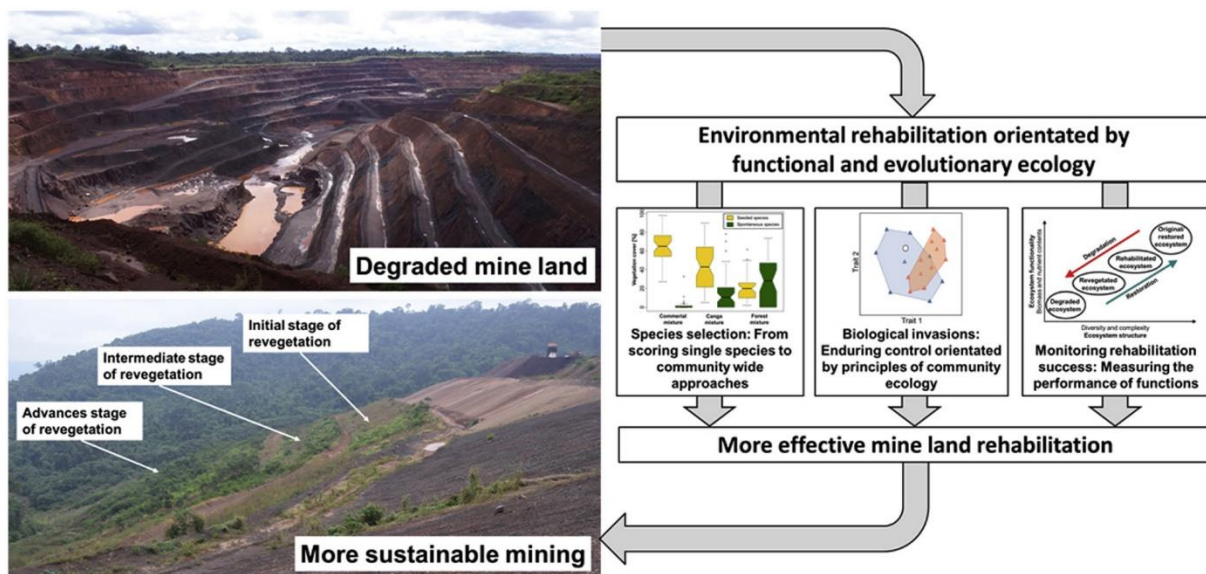


Figura 2 - Revegetação de áreas impactadas pela mineração a partir da seleção de espécies nativas, controle de espécies invasoras e monitoramento da reabilitação.

Fonte: Gastauer *et al.*, 2018.

Uma das estratégias iniciais utilizadas para aumentar o sucesso da revegetação em programas de RAD tem sido a utilização de solo orgânico (*Top soil*) e pilhas de resíduos com adubação do substrato para o aumento de nutrientes e matéria orgânica (Carvalho *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Gastauer *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2022). O próximo passo é realizado com vista na diminuição da perda de biodiversidade de plantas por meio da revegetação (Zappi *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019a), sendo essencial a identificação de plantas nativas de alto rendimento nesses ambientes, a fim de explorar seu potencial como elementos secundários de sucessão nas áreas após a mineração. Estas espécies devem apresentar papel facilitador, facilidade de propagação, importância na composição de comunidades nativas de canga e facilidade de propagação em áreas mineradas (Zappi *et al.*, 2018). Tais espécies podem representar um potencial para a revegetação de áreas mineradas, como os ecossistemas presentes na Serra dos Carajás, contribuindo para a diminuição da perda de biodiversidade local desses ambientes e recuperação dos serviços ecossistêmicos com estabilidade (Ramos *et al.*, 2019b).

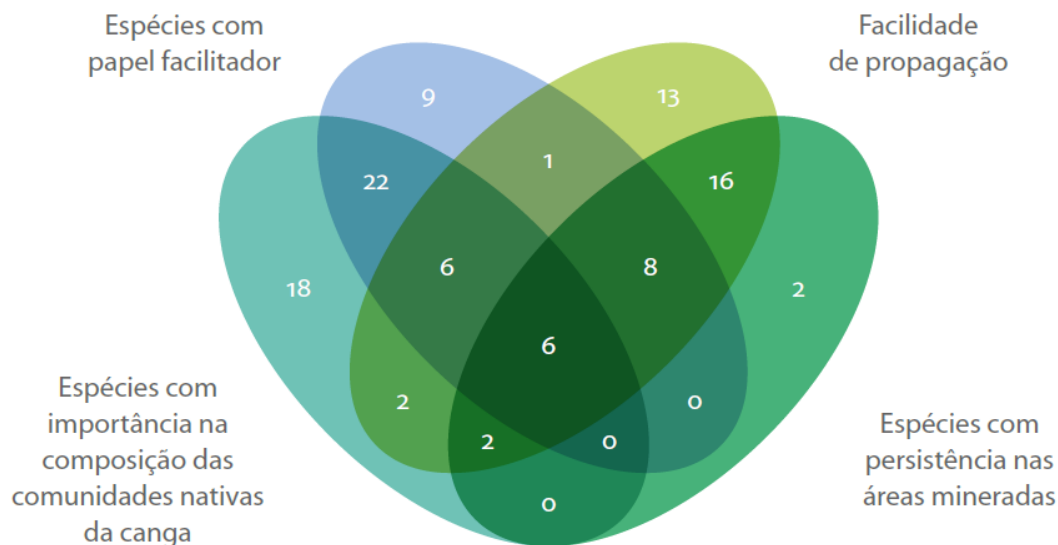


Figura 3 - Quantidade de espécies contempladas em cada critério para recuperação de áreas mineradas.

Fonte: Zappi *et al.*, 2018.

O programa de RAD da Vale inclui dezenas de espécies com potencial investigado para serem reintroduzidas em áreas mineradas em reabilitação (Zappi *et al.*, 2018). Apenas seis espécies (*Mimosa acutistipula*, *Dioclea apurensis*, *Bauhinia pulchella*, *Parkia platycephala*, *Lippia grata* e *Pilocarpus microphyllus*) atendem todos os critérios definidos (Figura 3). Entre essas espécies mais promissoras, estão plantas da família Fabaceae, incluindo a *Dioclea apurensis* e *Mimosa acutistipula*, que apresentam altas persistências em canga arbustiva e em áreas mineradas em reabilitação (Carvalho *et al.*, 2018; Zappi *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019b).

1.3. *Dioclea apurensis* Kunth (Fabaceae)

Dentre as espécies nativas encontradas próximas as áreas de mineração na Serra dos Carajás, estão plantas do gênero *Dioclea*, que pertence à família Fabaceae, com 40 espécies identificadas, sendo 32 presentes no Brasil (Queiroz, 2009). Essas espécies ocorrem nos estados do Pará, Amazonas e Roraima, habitando principalmente os campos amazônicos (Campinas, Cerrado e Canga) e áreas de borda florestal (Maxwell, 2011; Zappi *et al.*, 2018). Elas estão distribuídas na América do Sul, América Central, Caribe, México e Ásia (Lewis *et al.*, 2005). Na canga, existem quatro espécies (*Dioclea bicolor* Benth, *Dioclea megacarpa* Rolfe, *Dioclea sclerocarpa* Ducke e *Dioclea apurensis* Kunth) (Faria *et al.*, 2011; Mattos *et al.*, 2018), sendo a *D. apurensis* (Cipó-olho-de-boi, Coronha) a mais utilizada na revegetação de pilhas de

resíduos e encostas a céu aberto para reabilitação de áreas impactadas pela mineração (Figura 4) (Giannini *et al.* 2017; Zappi *et al.*, 2018).



Figura 4 – *Dioclea apurensis*.

Fonte: Zappi *et al.*, 2018.

D. apurensis é considerada uma espécie metalófila (Whiting *et al.*, 2004; Preite *et al.*, 2019), de hábito trepadeira, com caule medindo até 1 cm de diâmetro, que apresenta tolerância a seca, crescimento rápido e sementes com boa taxa de germinação (Zappi *et al.*, 2018). Além de apresentar alta nodulação a partir de interações com microrganismos em substrato com depleção de nutrientes (Ramos *et al.*, 2019a), esta espécie é considerada pelo grupo de Tecnologia Ambiental do Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS) como uma das mais promissoras ao considerar sua alta taxa de sobrevivência nas áreas mineradas em reabilitação (Giannini *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2019a).

Como a *D. apurensis* ocorre naturalmente na canga da Serra dos Carajás, é provável que apresente mecanismos biológicos específicos que permitam sua sobrevivência em ambientes desafiadores (Ramos *et al.*, 2019a). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos em sua adaptação nesses ambientes e quais as principais alterações que ocorrem ao serem introduzidas nas áreas em reabilitação quando comparadas às áreas de canga nativas.

1.4. *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* Barneby (Fabaceae)

O gênero *Mimosa* inclui 479 espécies (Barneby, 1991) pertencentes à família Fabaceae. A espécie *Mimosa acutistipula* (Vem-cá-meu-bem, Jurema) é a mais representativa do gênero na revegetação de áreas mineradas. De hábito arbustivo, com altura chegando até 6 metros, ela é uma planta endêmica do Brasil (Figura 5), ocorrendo nos estados no Pará, Maranhão e Mato Grosso. No Norte do Brasil, esta espécie habita ambientes de cangas ferruginosas, onde atinge altas persistências (Nunes *et al.*, 2015; Schaefer *et al.*, 2016), se desenvolvendo em solos ricos em ferro, pobres em nutrientes e de pH ácido, podendo ser encontrada regularmente em vegetação rupestre arbustiva, em campo rupestre sobre canga e áreas de transição de vegetação (Zappi *et al.*, 2018).



Figura 5 – *Mimosa acutistipula*.

Fonte: Zappi *et al.*, 2018.

O grupo de Tecnologia Ambiental do ITV-DS considera a *M. acutistipula* como uma das espécies mais promissoras por sua alta representatividade em áreas de revegetação, apresentando capacidade de tolerância a seca, alta taxa de germinação e capacidade de associação com microrganismos do solo (Sprent, 2009; Zappi *et al.*, 2018).

Assim como para a *D. apurensis*, o fato de a *M. acutistipula* ocorrer naturalmente na canga da Serra dos Carajás sugere que esta espécie apresente mecanismos biológicos específicos para sua adaptação em ambientes severos.

1.5. A EXIGÊNCIA DE ADAPTAÇÕES EM PLANTAS ESTABELECIDAS EM CANGA E EM ÁREAS MINERADAS

No ambiente natural de canga, as plantas estão sujeitas a diversos agentes estressores, como altas temperaturas diárias com pouca variação (Gastauer *et al.*, 2020), períodos de seca, substratos ácidos (pH ~ 4) e pobres em nutrientes, além de apresentarem altos níveis de metais, especialmente o Fe (Jacobi *et al.*, 2007; Skirycz *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2015). Após a mineração, os solos são caracterizados pelos baixos níveis de nutrientes e matéria orgânica, bem como apresentarem alta resistência para penetração das raízes devido à remoção da camada superficial e compactação (Guedes *et al.*, 2021; Gastauer *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2022). Nesse contexto, é essencial a identificação de mecanismos adaptativos que comprovem as possibilidades de estabilidade a longo prazo das espécies a serem reintroduzidas para recuperação da biodiversidade em áreas mineradas.

Para lidarem com o déficit hídrico, as plantas desenvolvem mecanismos para se adaptarem e sobreviverem nesses ambientes (Cao *et al.*, 2017). Para isto devem ocorrer mudanças nos níveis de expressão gênica e síntese de proteínas envolvidas em diferentes processos biológicos. Dentre os mecanismos mais comuns observados em plantas submetidas ao déficit hídrico, estão as adaptações nos sistemas de transporte de membranas vegetais, que desempenham um papel significativo no ajuste à escassez de água, onde transportadores de íons na membrana estão envolvidos na manutenção da homeostase celular (Jarzyniak e Jasiński, 2014). Essa manutenção depende de vários sinais moleculares, entre eles os desencadeados pelo ácido abscísico (ABA). Sob condições de estresses como o déficit hídrico e altas temperaturas, o conteúdo de ABA aumenta consideravelmente, sendo transportado por vascularização até as folhas, onde desencadeia uma cascata de sinalização nas células-guarda para induzir o fechamento estomático e reduzir a perda de água (Ernst *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2016). Assim, o ABA contribui para a adaptação e sobrevivência de plantas em condições desfavoráveis (Osakabe *et al.*, 2014; Goodger *et al.*, 2010).

Além de enfrentarem períodos de deficiência hídrica em solos com baixa capacidade de retenção de água, plantas estabelecidas em canga devem suportar o excesso de metais no solo, pois são zonas onde se espera que o ferro e vestígios de outros metais disponíveis nos substratos causem danos às plantas (Zappi *et al.*, 2018; Guedes *et al.*, 2021; Gastauer *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2022). Sob essas condições restritivas, as plantas devem desenvolver mecanismos adaptativos específicos (Tiwari e Lata, 2018). Tais alterações são promovidas para evitar a inibição de enzimas citoplasmáticas vitais e o dano às estruturas celulares devido ao estresse oxidativo (Mishra *et al.*, 2017; Jalmi *et al.*, 2018).

A toxicidade dos metais pode ser consequência do deslocamento de metais essenciais em biomoléculas-chave, como enzimas e fatores de transcrição, e a ligação do metal aos grupos tiol e a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Daghino *et al.*, 2016). O dano mais intenso causado pelo excesso de Fe é o rompimento da homeostase redox das células pela geração de ROS na presença de ferro na forma de Fe^{2+} , que é absorvido mais facilmente pelas plantas. Na presença de Fe^{2+} , o H_2O_2 pode dar origem a $\text{OH}^\cdot$ via reação de Fenton. Além de apresentarem alta reatividade com moléculas de ácidos nucleicos e lipídios (Mittler, 2017), essas moléculas também podem se ligar às proteínas, interagindo com resíduos de cisteínas (Cys-S) em ligações dissulfetos, formando, por exemplo, ácido sulfênico (Cys-SOH) (Reczek e Chandel, 2015; Mittler, 2017). Entre os efeitos mais característicos da toxidez por metais em plantas são a inibição do crescimento e baixo acúmulo de biomassa, o aparecimento de cloroses, além da diminuição da taxa de fotossíntese e desequilíbrio na assimilação de nutrientes (Sigh *et al.*, 2015).

Tiwari e Lata (2018) relataram que o estresse por metais induz modificações metabólicas que permitem que a planta cresça em um ambiente estressante. Isto inclui a indução da ativação de vias de sinalização distintas, como a proteína quinase ativada por mitógenos e dependente de cádmio, as próprias ROS, e fitormônios que induzem a expressão de fatores de transcrição e/ou genes em resposta ao estresse. Plantas adaptadas para sobreviverem em solos com altas concentrações de Fe podem expulsar o excesso do metal ou acumular em vacúolos para mantê-lo distante de outras células e moléculas com auxílio de proteínas críticas que desempenham esta função (Skirycz *et al.*, 2014), sendo este último mecanismo o mais observado. Portanto, espera-se que as espécies adaptadas em canga apresentem mecanismos moleculares para mobilização e desintoxicação do ferro a partir das raízes.

Por outro lado, ROS são produzidas de diversas maneiras e em diferentes compartimentos celulares em condições normais de crescimento (Mittler, 2017; Xie *et al.*, 2019), sendo relacionadas à regulação de vias de sinalização que muitas vezes ocorrem em respostas iniciais a estresses ambientais (Fan *et al.*, 2016; Mittler, 2017; Jalmi *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2019). Na presença de luz, ROS são formadas nos cloroplastos e peroxissomos, enquanto que em condições escuras são formadas principalmente nas mitocôndrias (Choudhury *et al.*, 2013). As ROS mais conhecidas são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2). No entanto, quando os níveis de ROS são aumentadas, as células vegetais estarão em um estado de estresse oxidativo, pois podem sobrecarregar os mecanismos de eliminação e se tornarem tóxicas, afetando uma grande variedade de funções celulares, fisiológicas e bioquímicas, onde os principais efeitos ocorrem a partir de danos as membranas celulares por meio da peroxidação lipídica, da oxidação de ácidos nucleicos, e da desnaturação de proteínas, além de comprometer o fluxo de nutrientes (Sharma *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 2017; Jalmi *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019). Assim, é importante que as ROS sejam mantidas em níveis basais, sendo considerado um fator determinante na capacidade de adaptação de espécies vegetais em diferentes ambientes (Mittler, 2017).

O equilíbrio nos níveis de ROS é mediado pelo sistema antioxidante, que conta com a ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Entre os antioxidantes enzimáticos estão as enzimas superóxido dismutases (SOD), peroxidases (POD) catalases (CAT), glutathione redutase (GR) e monode-hidroascorbato redutase (MDAR), enquanto glicina betaína e prolina estão entre os antioxidantes não enzimáticos.

Plantas que crescem em canga ou em áreas em mineradas em reabilitação também sofrem com baixos níveis de nutrientes disponíveis nos substratos. O principal nutriente relatado com baixa disponibilidade em canga é o fósforo (P) (Skirycz *et al.*, 2014; Guedes *et al.*, 2021; Gastauer *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2022), que é essencial ao crescimento e desenvolvimento das plantas, onde atua em processos metabólicos que incluem a respiração e fotossíntese, além de ser um constituinte estrutural em biomoléculas, como ácidos nucleicos, fosfolipídios, NADPH e ATP.

A aquisição de P pelas plantas requer uma série de mecanismos organizados para sua absorção, transporte e reserva. No entanto, ele pode estar fortemente ligado às partículas do solo, resultando em uma baixa mobilidade e concentração disponível para as plantas (Alexova

e Millar, 2013; Muneer e Jeong, 2015). Solos tropicais ácidos são severamente limitados pela disponibilidade de P (Muneer e Jeong, 2015), e em solos de canga o alto conteúdo de minerais se torna um agravante (Zappi *et al.*, 2018). Já solos de áreas em reabilitação é caracterizado pelo baixo teor de nutrientes e matéria após a atividade de mineração (Zappi *et al.*, 2018). Para vencer esses desafios, as plantas precisam produzir proteínas e substâncias que irão aumentar a aquisição de fosfato inorgânico (Pi). Um dos mecanismos adotados é a solubilização de Pi livre a partir do aumento de secreção de ácidos orgânicos na rizosfera, ou mobilizando Pi do solo através da secreção de enzimas hidrolíticas (Alexova e Millar, 2013). Outra estratégia que as plantas empregam é o aumento da área de superfície do sistema radicular para acessar um maior volume de solo (Ma *et al.*, 2001; Yuan e Liu, 2008). Em várias espécies vegetais dicotiledôneas ocorre a inibição do crescimento radicular primário e o aumento da formação de raízes e pelos laterais (Vance *et al.*, 2003; Alexova e Millar, 2013).

Adaptações em resposta à escassez de P ocorrem de formas variadas entre diferentes espécies de plantas e dependem da indução ou inibição de centenas de genes (Tran *et al.*, 2010a). A resposta à escassez de P também depende de uma série de mecanismos pós-transcricionais, regulações alostéricas e modificações pós-traducionais das proteínas (Alexova e Millar, 2013) que, além de serem responsáveis pelo controle da expressão gênica, também irão determinar o sucesso nas atividades e funcionalidades das proteínas envolvidas nessa resposta.

Outro aspecto a ser considerado é que a aquisição de P por plantas é significativamente aumentada pela presença de micorrizas arbusculares formadas com fungos que habitam o solo (Tran *et al.*, 2010a). A maioria das vantagens ecológicas para plantas micorrízicas estaria relacionada ao aumento da superfície de adsorção de água e nutrientes, especialmente em plantas desenvolvidas sob condições estressantes. No solo, fungos micorrízicos podem solubilizar nutrientes como P e transferir para o hospedeiro como uma maneira de obter carbono fotossinteticamente fixo. Nesse contexto, espera-se também que plantas estabelecidas em canga ou em áreas mineradas apresentem mecanismos adaptativos para resistirem a escassez de P.

É comum que plantas estabeleçam associações simbióticas com microrganismos benéficos do solo para sobreviverem em ambientes nocivos. Associações microbiológicas têm sido relatadas em plantas que se desenvolvem em ecossistemas afetados por atividades de mineração (Hristozkova *et al.*, 2017; Sobariu *et al.*, 2017). Estudos recentes mostraram que comunidades fúngicas e bacterianas associadas à rizosfera desempenham um papel essencial

no estabelecimento de espécies nativas crescidas em canga e em áreas mineradas (Fowler *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020; Trindade *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2021). Portanto este mecanismo deve ser considerado igualmente essencial em espécies reintroduzidas para revegetação de áreas mineradas na Serra dos Carajás.

1.6. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE RESPOSTAS A ESTRESSES EM PLANTAS

Condições de estresses abióticos estimulam diferentes mecanismos de adaptação, envolvendo amplas alterações fisiológicas e bioquímicas que podem resultar em mudanças adaptativas. Diferentes processos estão relacionados às alterações na expressão gênica, no transcriptoma e proteoma, que culminam em mudanças bruscas no metabolismo da planta. Neste sentido, tem-se percebido a importância da proteômica utilizando órgãos específicos, especialmente folhas e raízes, a fim de identificar alterações envolvidas nessas alterações metabólicas (Komatsu e Hossain, 2013).

O sequenciamento do genoma de várias espécies tem possibilitado a criação de bancos de dados que permitem o avanço na obtenção de resultados utilizando tecnologias de análises mais precisas das respostas aos diversos estresses ambientais (Vanderschuren, *et al.*, 2013). Nesse contexto, técnicas cromatográficas (cromatografias líquida e gasosa) acopladas a espectrômetros de massas têm sido amplamente aplicadas em trabalhos para a elucidação de alterações nos componentes proteicos em resposta a condições de estresses abióticos que mais prejudicam culturas agrícolas no mundo inteiro (Alam *et al.*, 2010; Nanjo *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015). No entanto, poucos trabalhos neste sentido são realizados com espécies não agrícolas.

A biologia molecular oferece diversas alternativas para o monitoramento ambiental. Entre elas, a proteômica traz diversas vantagens que ajudam a entender o metabolismo das plantas que crescem sob condições restritivas, bem como a conhecer os efeitos na microbiota do solo (Berka *et al.*, 2020; Mattarozzi *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Pesquisas que empregam a proteômica incluem, por exemplo: i) colonização de ecossistemas poluídos por metais (Herrera *et al.*, 2018); ii) resposta à deficiência de nutrientes (López-Millán *et al.*, 2013), entre outros.

Além de avaliar aspectos morfológicos e fisiológicos, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na adaptação das espécies vegetais é fundamental para o

monitoramento dos programas de RAD, ajudando na identificação de necessidades e na avaliação das possibilidades de estabilização da revegetação em áreas em reabilitação. Portanto, a proteômica pode ser considerada uma ferramenta poderosa em estudos ambientais para entender os mecanismos envolvidos nas adaptações de espécies florestais.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Conhecer mecanismos moleculares associados às adaptações de espécies da família Fabaceae (*Dioclea apurensis* e *Mimosa acutistipula*) em ecossistemas de canga e que podem apoiar seus estabelecimentos em áreas mineradas em reabilitação na Serra dos Carajás, Pará.

2.2. ESPECÍFICOS

- i) Obter os perfis proteicos de raízes de plantas das espécies *Dioclea apurensis* e *Mimosa acutistipula* estabelecidas em seus ambientes nativos e em áreas mineradas em reabilitação.
- ii) Identificar proteínas associadas aos mecanismos moleculares envolvidos em adaptações a possíveis estresses ambientais.

3. CAPÍTULO I: PERFÍS PROTEICOS REVELAM MECANISMOS ADAPTATIVOS DA ESPÉCIE *Dioclea apurensis* Kunth ESTABELECIDADA EM ÁREAS MINERADAS EM REABILITAÇÃO NA AMAZÔNIA ORIENTAL

RESUMO

Dioclea apurensis Kunth é nativa de afloramentos rochosos ferruginosos (conhecidos como canga) na Amazônia oriental. As cangas são consideradas “hotspots” de diversidade biológica e possuem uma das maiores jazidas de minério de ferro do mundo. Após a mineração, essas zonas representam ambientes desafiadores à reabilitação do ecossistema. As estratégias para reabilitação de ecossistemas degradados pela mineração incluem a revegetação com plantas nativas de canga para diminuição da perda de biodiversidade. A *D. apurensis* é considerada uma espécie promissora para revegetação de áreas mineradas devido sua alta abrangência nesses ambientes. Assim, espera-se que mecanismos moleculares contribuam para o seu estabelecimento. Neste estudo, comparamos os perfís proteicos radiculares de plantas da espécie *D. apurensis* crescendo em canga e em área minerada em reabilitação para caracterizar os principais mecanismos que podem permitir o crescimento e estabelecimento da espécie nesses ecossistemas. Os resultados mostraram que as proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, déficit hídrico, excesso de ferro, deficiência de fósforo, bem como associadas à simbiose com microrganismos apresentaram níveis mais elevados em plantas de canga. Essas proteínas estão envolvidas em mecanismos críticos que podem apoiar a alta taxa de estabelecimento da *D. apurensis* também em áreas mineradas em reabilitação.

Palavras-chave: estresse abiótico, proteômica, reabilitação de áreas mineradas, simbiose

ABSTRACT

Dioclea apurensis Kunth is native to ferruginous rocky outcrops (known as *canga*) in the eastern Amazon. The *cangas* are considered “hotspots” of biological diversity and have one of the largest deposits of iron ore in the world. After mining, these zones represent challenging environments for ecosystem rehabilitation. Strategies for the rehabilitation of ecosystems degraded by mining include revegetation with native *canga* plants to reduce the loss of biodiversity. *D. apurensis* is considered a promising species for revegetation of mined areas due to its wide range in these environments. Thus, molecular mechanisms are expected to contribute to its establishment. In this study, we compared the root protein profiles of plants of the species *D. apurensis* growing in *canga* and in rehabilitating minelands to characterize the main mechanisms that may allow the growth and establishment of the species in these ecosystems. The results showed that proteins involved in the response to oxidative stress, water deficit, excess iron, phosphorus deficiency, as well as those associated with symbiosis with microorganisms showed higher levels in *canga* plants. These proteins are involved in critical mechanisms that may support the high rates of establishment of *D. apurensis* also in rehabilitating minelands.

Keywords: abiotic stress, proteomic, rehabilitating minelands, symbiosis

INTRODUÇÃO

A extração de minério de ferro na Amazônia oriental ocorre principalmente em afloramentos ferruginosos cercados por florestas tropicais na Província Mineral de Carajás, que representa um dos maiores reservatórios de ferro do mundo (dos Santos *et al.*, 2015). Este ecossistema é caracterizado por uma alta diversidade vegetal que formam diferentes fitofisionomias conhecidas como cangas (Jacobi *et al.*, 2007). As comunidades vegetais que crescem nas cangas estão sujeitas a condições ambientais adversas, como intensa radiação ultravioleta (UV) e altas temperaturas (Skirycz *et al.*, 2014), bem como a deficiência hídrica devido à baixa capacidade de retenção de água influenciada pela composição do solo (Jacobi *et al.*, 2007; Skirycz *et al.*, 2014). Além disso, os solos de canga são caracterizados pela baixa disponibilidade de fósforo (P) causada pela alta adsorção de P pelos óxidos de ferro e alumínio (Lehmann *et al.*, 2001). As plantas requerem várias adaptações para crescerem e colonizarem tais ecossistemas.

A mineração de ferro no Brasil ocorre essencialmente em minas a céu aberto, incluindo as da província mineral de Carajás (Gastauer *et al.*, 2019). As áreas de extração de minério de ferro são caracterizadas pela remoção da vegetação e do solo, e formação de declividades acentuadas (Carvalho *et al.*, 2020). Estudos recentes avaliaram diferentes plantas na reabilitação de áreas impactadas pela mineração de ferro na Amazônia, principalmente espécies nativas de canga (Ramos *et al.*, 2019b). Essas espécies têm papel crucial no sucesso de reabilitação de áreas mineradas, reduzindo a perda de biodiversidade local e contribuindo para a recuperação progressiva dos serviços ecológicos.

A revegetação é uma prática fundamental para a reabilitação de áreas mineradas. Para isso é necessário identificar espécies nativas capazes de lidar com as condições ambientais estressantes como as de canga e entender os mecanismos adaptativos que podem favorecer as altas persistências dessas espécies em áreas mineradas a longo prazo (Gastauer *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2019b). Plantas do gênero *Dioclea* (Fabaceae) podem crescer em áreas mineradas em reabilitação (Queiroz *et al.*, 2009), sendo a espécie *Dioclea apurensis* Kunth considerada uma das mais promissoras para a revegetação (Zappi *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019a). *D. apurensis* tem sido frequentemente utilizada para a revegetação de pilhas de resíduos em minas a céu aberto em projetos de recuperação de áreas degradadas (RAD) devido à facilidade de ser encontrada em ecossistemas de canga nativa, alta produção de sementes e rápido crescimento (Giannini *et al.* 2017).

Alterações metabólicas adaptativas para tolerância aos estímulos abióticos e associações simbióticas com microrganismos do solo podem levar a um estabelecimento bem-sucedido sob condições ambientais adversas. Apesar de reconhecer a importância da reintrodução de espécies nativas para a reabilitação de áreas mineradas, poucos estudos analisam mecanismos moleculares de plantas nativas utilizadas em programas RAD. O objetivo deste estudo foi analisar os perfis proteicos de raízes de *D. apurensis* crescidas em canga e em áreas mineradas em reabilitação a fim de identificar proteínas envolvidas em mecanismos moleculares adquiridos em canga e que estejam relacionados à tolerância a estresses ambientais. Essas características devem favorecer o estabelecimento desta espécie em áreas mineradas em reabilitação diante de possíveis eventos estressantes.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAGEM DOS SUBSTRATOS DOS SOLOS E ANÁLISES QUÍMICAS

As amostras foram coletadas no final da estação chuvosa (maio de 2018) na Serra dos Carajás, Pará, norte do Brasil. Os locais de amostragem incluíram: i) um ecossistema de canga herbáceo arbustivo nativo com mínima intervenção antrópica (6°00'41,0"S 50°17'45,0"W); e ii) uma área minerada em reabilitação (RM) com pilhas de resíduos de mineração de ferro (6°02'32,0"S 50°07'04,0"W), com programa de revegetação iniciado em 2014, quando a aplicação de sementes de *D. apurensis* foi realizada por hidrossemeadura contendo adubação com NPK na proporção 14-04-08 (8 kg para cada 8x12 m de substrato de solo) e matéria orgânica.

O clima da região é tropical quente com estação chuvosa de novembro a março e estação seca de maio a setembro, precipitação média anual de 2.033 mm e temperaturas variando entre 25,1°C a 26,3°C (Kettler *et al.*, 2001; Gastauer *et al.*, 2020). Amostras de solos rizosféricos (n = 5) foram coletadas próximo às raízes de *D. apurensis* crescendo naturalmente em canga e em uma área minerada em reabilitação. Amostras de solo foram submetidas a análises químicas e físicas. Após secagem ao ar, as amostras foram peneiradas com malha de 2 mm. O pH foi determinado na razão substrato solo/água de 1:2,5 e o teor de carbono orgânico foi determinado pelo método do dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). O P, K, B, Zn, Fe, Mn e Cu disponíveis foram determinados usando o método Mehlich-1 (0.05 mol L⁻¹ HCl + 0.0125 mol L⁻¹ H₂SO₄), S-SO₄⁻

² por fosfato de cálcio monobásico em 0,01 M, e o teor de N total foi determinado pelo método de Kjeldahl (Kirk *et al.*, 1950). A textura do solo foi determinada conforme descrito por Kettler *et al.* (2001).

AMOSTRAGEM DE RAÍZES E ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS

Raízes de cinco plantas individuais de *D. apurensis* foram coletadas em cada local de amostragem, mantidas em tampão fenol/SDS (dodecil sulfato de sódio) frio e em seguida transportadas ao laboratório para processamento. Foram separados cerca de 3 g do material macerado para a extração de proteínas de cada uma das cinco replicatas de raízes de plantas amostradas em cada ambiente. Cada amostra recebeu 10 mL de tampão contendo sacarose (1,5 M), Tris-HCL (1M, pH 8), dodecil sulfato de sódio (SDS, 10%), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, 100 mM), polivinilpolipirrolidona (PVPP), 500 µL água ultrapura, com adição de 100 µL de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 400 µL de β-mercaptoetanol. As amostras foram sonicadas por cinco repetições de 30 segundos em temperatura ambiente. Os extratos foram divididos em dez microtúbulos cada, seguidos da adição de 700 µL de fenol por microtúbulo. As amostras foram agitadas por 15 minutos em vórtex e centrifugadas por 8 minutos a 14000 rpm. O conteúdo fenólico foi transferido para novos microtúbulos e a operação foi repetida para eliminar qualquer resíduo da fase aquosa ou SDS. Foram adicionados 1300 µL de acetato de amônia (100 mM) em metanol (100%) para precipitação de proteínas durante 24 horas à -80 °C. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 8 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi transferido para um novo microtúbulo e lavado três vezes com acetona 80%. Uma última lavagem foi realizada com etanol 70% e o precipitado seco à temperatura ambiente em concentrador a vácuo por cerca de 7 minutos. Os extratos foram solubilizados em 200 µL de RapiGest (Waters, Milford, MA, USA) 0,2%. As concentrações de proteína nas amostras foram determinadas no Qubit 2.0 (Invitrogen, Inc.), seguindo as recomendações do fabricante, utilizando 3 µL de extrato.

Em seguida, foram digeridas 50 µg de proteínas de cada amostra. A preparação para digestão foi realizada com a adição de RapiGest (0,1%) (Waters, Milford, MA, USA) na proporção de 1:1, seguida pela adição de ditioneitol (DTT, 5 mM) por 25 minutos a 56 °C e iodoacetamida (IAA, 14 mM) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Uma nova adição de DTT (5 mM) foi realizada, aguardando-se mais 15 minutos de incubação à temperatura

ambiente, seguido pela adição de CaCl_2 (1 mM). O tratamento com tripsina (V5280, Promega, Madison, WI) a $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ foi realizado por 20 horas a 37°C . Foi adicionado ácido trifluoacético (TFA) na concentração final de 0,4% do volume da amostra a fim de parar a reação da tripsina. O pH das amostras foi elevado para 10 com adição de hidróxido de amônio (NH_4OH).

ANÁLISES DOS PROTEOMAS

A identificação e quantificação das proteínas foram realizadas em cromatografia líquida de ultra performance nanoACQUITY UPLC® (Milford, MA, EUA), configurada para fracionamento em duas dimensões conforme relatado em Herrera *et al.* 2018. Cinco microgramas dos peptídeos foram analisados com cinco réplicas analíticas. A primeira dimensão usou uma coluna de aprisionamento XBridge BEH130 C18 de $5 \mu\text{m}$ ($300 \mu\text{m} \times 50 \text{ mm}$) e Symmetry C18 $5 \mu\text{m}$ ($180 \mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$) a uma taxa de fluxo de $2000 \mu\text{L min}^{-1}$. A segunda dimensão usou uma coluna analítica de $1,7 \mu\text{m}$ BEH130 C18 $1,8 \mu\text{m}$ ($100 \mu\text{m} \times 100 \text{ mm}$), a uma taxa de fluxo de $400 \mu\text{L min}^{-1}$. As amostras foram separadas em cinco frações com gradiente de 10,8, 14,0, 16,7, 20,4 e 65,0% de acetonitrila. O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas NanoLock ESI-Q-ToF SYNAPT G2-S (Waters). A aquisição variou de 50 a 2.000 Da, no modo MS^E (análise independente de dados) a uma taxa de varredura de 0,5 s e um atraso entre varreduras de 0,1 s.

Os dados foram processados no software Progenesis QI (Waters) para identificação e quantificação, utilizando o banco de dados Viridiplantae do UniProt (UniProtKB/swiss-prot, uniprot.org). A identificação de proteínas foi aceita se a probabilidade de identificação de peptídeos fosse maior que 90% e proteínas com 95%. Os níveis de significância das abundâncias diferenciais de proteínas foram determinados pela aplicação do teste ANOVA ($p < 0,05$).

As análises de dados seguintes foram realizadas considerando as proteínas diferencialmente abundantes com $p < 0,05$ e “fold change” $> 1,5$. Para comparar o proteoma de *D. apurensis* crescidas em canga ou RM, as análises de componentes principais (PCA) das proteínas com abundâncias diferenciais significativas ($p < 0,05$ e “fold change” $> 1,5$) foram produzidas no software R v3.6.3 (R Core Team 2018; <https://www.R-project.org>), com os pacotes FactoMineR, Factoshiny e Factoextra. A anotação funcional dessas proteínas foi

realizada no OmicsBox v1.2.4 (bioBam), utilizando o banco de dados do Uniprot (UniProtKB/swiss-prot, uniprot.org). As análises de enriquecimento da via da Enciclopédia de Gene e Genoma de Kyoto (KEGG) foram realizadas no software KOBAS v3.0. (Mao *et al.*, 2005) (kobas.cbi.pku.edu.cn) com bancos de dados da *Arabidopsis thaliana*. O pacote R ggplot2 foi utilizado para a visualização das vias KEGG enriquecidas. As redes de interação proteína-proteína foram previstas com base em análises funcionais utilizando o software STRING (ferramenta de pesquisa para recuperação de genes/proteínas em interação) v11.0 (<http://string-db.org/>) para funções de genes homólogos da *Arabidopsis thaliana*.

RESULTADOS

PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DE SUBSTRATOS DOS SOLOS EM CANGA E DE ÁREA MINERADA

Os solos de canga se diferenciam de solos em RM conforme pode ser observado na tabela 1. Os substratos de solo de áreas mineradas em recuperação (RM) apresentaram maior proporção de argila, enquanto os solos de canga apresentaram maior proporção de areia. Os solos de canga foram mais ácidos que os solos de RM. Solos de canga apresentaram maior teor de matéria orgânica do que os solos de RM. O nitrogênio total (N) foi maior nos solos de canga, enquanto o fósforo disponível (P) foi maior nos substratos de solos de RM. As concentrações de metais diferem entre os ambientes; a concentração de cobre e principalmente de ferro foram maiores em solos de canga, enquanto manganês e zinco foram maiores em solos de RM.

Tabela 1. Características físicas e químicas de solos em canga e em RM. Os resultados são médias $\pm$ desvios padrão para n=5.

	RM	Canga
Clay (g kg ⁻¹)	486.7 $\pm$ 37.2	287.5 $\pm$ 103
Silt (g kg ⁻¹)	158.3 $\pm$ 40.8	87.5 $\pm$ 75
Sand (g kg ⁻¹)	355 $\pm$ 68.9	625 $\pm$ 177
pH H ₂ O	6.1 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.6
pH CaCl ₂	5.3 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3
Available P (mg dm ⁻³)	19.5 $\pm$ 15.9	1 $\pm$ 0.9
Total N (dag kg ⁻¹)	0.1 $\pm$ 0.06	0.4 $\pm$ 0.3
Organic matter (dag kg ⁻¹)	1.4 $\pm$ 0.6	7.7 $\pm$ 0.9
Na (mg dm ⁻³)	4.7 $\pm$ 0.6	11.4 $\pm$ 6.2
K (mg dm ⁻³)	22.6 $\pm$ 6.8	22.7 $\pm$ 6.8
B (mg dm ⁻³)	0.1 $\pm$ 0.03	0.2 $\pm$ 0.08

Cu (mg dm ⁻³)	0.6 ± 0.3	1.8 ± 0.5
Fe (mg dm ⁻³)	11.3 ± 6.3	372 ± 92
Mn (mg dm ⁻³)	59.7 ± 9.4	2.8 ± 1.5
Zn (mg dm ⁻³)	2.1 ± 1.6	1.4 ± 0.9

PERFIS PROTEICOS DE *Dioclea apurensis*

No total, foram identificadas e quantificadas 1401 proteínas, sendo que 396 apresentaram abundância diferencial significativa ($p < 0,05$) entre as raízes de ambos os ambientes (Tabela Suplementar 1). Apenas duas proteínas foram detectadas exclusivamente nas raízes de RM, enquanto 19 foram identificadas apenas nas raízes de canga (Tabela Suplementar 1). Entre essas proteínas, 291 apresentaram maiores níveis em raízes de canga, enquanto 105 apresentaram maiores níveis em raízes de RM. As análises de componentes principais (PCA) das 1401 proteínas (Figura 1a) e 396 proteínas filtradas (Figura 1b) mostraram a separação entre amostras de raízes de plantas de canga e raízes de plantas de RM. As amostras de RM apresentaram maior separação.

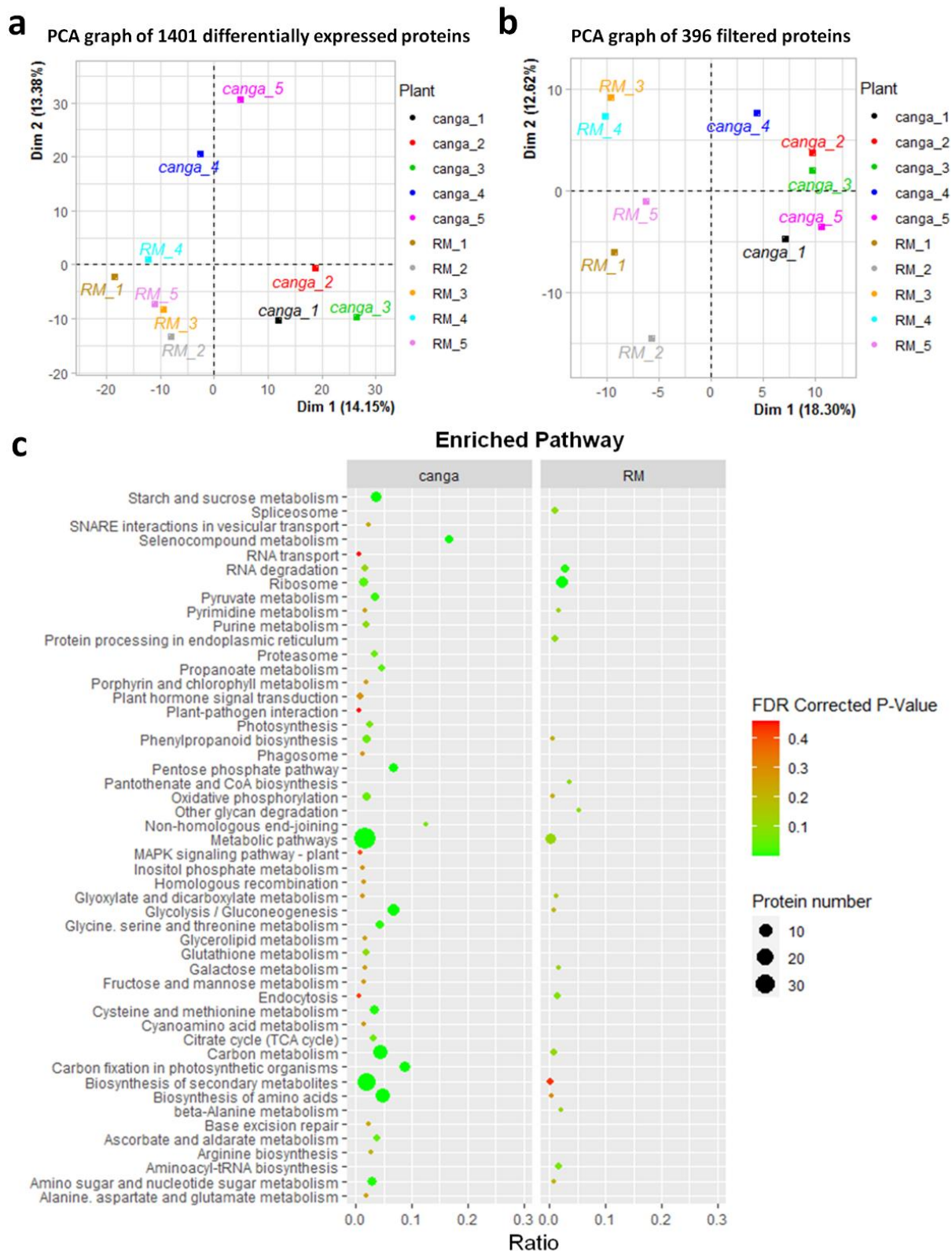


Figura 1 - PCA e análise de enriquecimento das proteínas com abundâncias diferenciais em raízes de *D. apurensis* amostradas de canga ou em áreas mineradas em reabilitação (RM). (a) PCA de 1401 proteínas com abundâncias diferenciais comparando cinco plantas de canga com cinco plantas de RM. (b) PCA de proteínas com abundâncias

diferenciais significativas com $p < 0,05$ e “fold change” $> 1,5$. (c) Análise de enriquecimento em processos biológicos das proteínas mais abundantes com valores significativos em plantas de cada ambiente.

A análise de enriquecimento realizada pela KOBAS mostrou que as proteínas mais abundantes em plantas de canga atuam em 44 processos biológicos principais, enquanto as proteínas mais abundantes em plantas de RM participam de pelo menos 20 processos biológicos (Figura 1c). Nas raízes de plantas de ambos os locais de amostragem, as categorias mais representativas incluíram proteínas envolvidas em resposta aos estímulos, principalmente relacionados a estresses abióticos, e proteínas envolvidas no crescimento e reprodução, incluindo proteínas envolvidas no metabolismo de carbono e biossíntese de metabólitos secundários (Figura 1c). As envolvidas nessas vias, especialmente na biossíntese de metabólitos secundários, onde estão incluídas proteínas essenciais nas respostas aos estresses abióticos, foram mais abundantes em plantas de canga.

INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA (PPI)

A análise de PPI foi realizada com 178 proteínas com níveis mais elevados nas raízes de plantas de canga (Figura 2) e 69 proteínas nas raízes de plantas de RM (Figura 2). A análise de PPI mostrou que a co-ocorrência gênica é a principal relação entre grande parte das proteínas mais abundantes em plantas de cada ambiente. Essas proteínas foram separadas em três grupos considerando seus níveis de interação e suas funções a partir da análise de enriquecimento funcional realizada pelo STRING, com valor de enriquecimento de PPI de $p < 1 \times 10^{-16}$ em plantas de canga e $p < 1,4 \times 10^{-6}$ em plantas de RM (Figura 2).

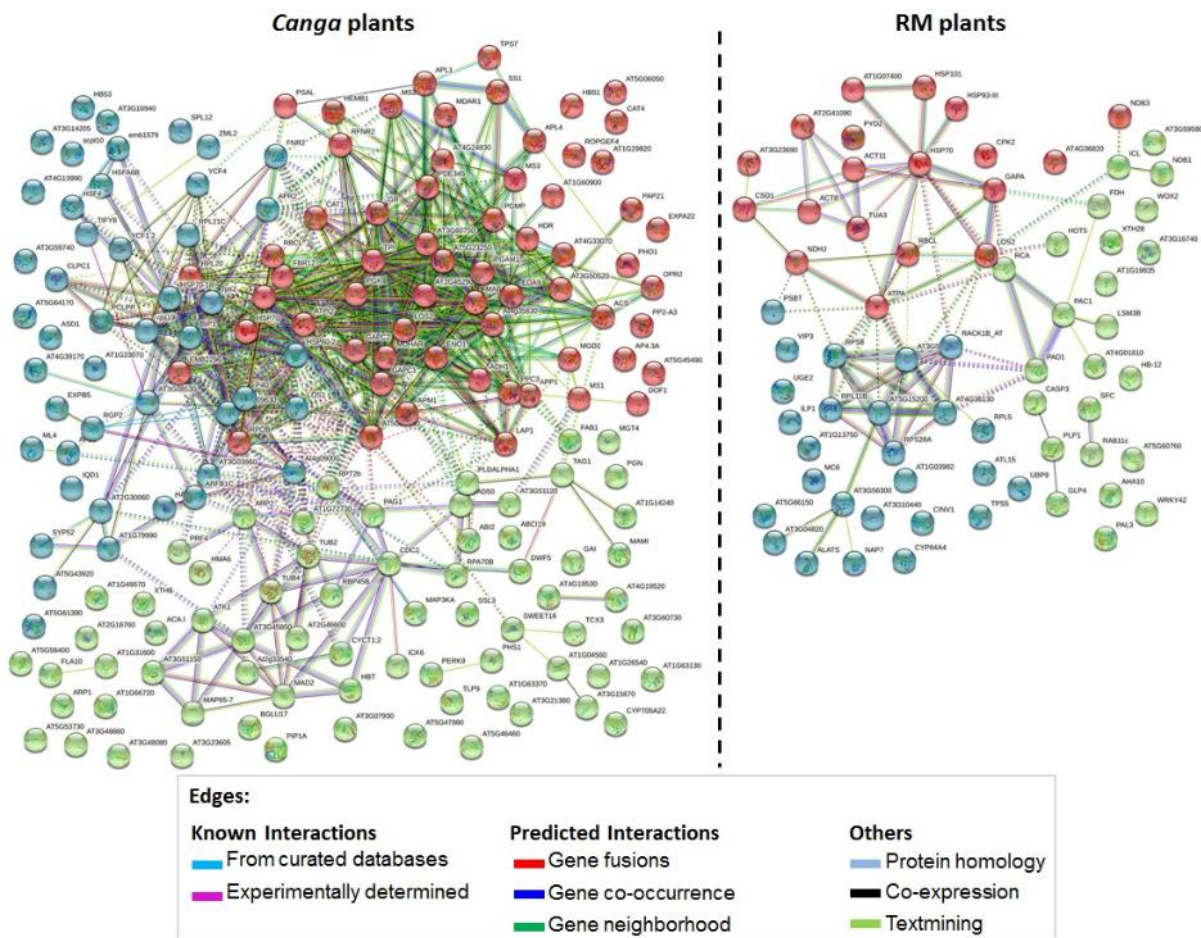


Figura 2 - Rede de interação proteína-proteína das proteínas com abundâncias diferenciais em *D. apurensis* em canga (à esquerda) e RM (à direita) separadas em 3 grupos ilustrados em verde, azul e vermelho. Os símbolos dos genes foram obtidos a partir de proteínas homólogas do banco de dados da *Arabidopsis thaliana* no uniprot.org, acessado em 10 de outubro de 2021. As linhas representam interações entre as proteínas, conforme descrito na figura. As linhas pontilhadas representam interações entre proteínas de diferentes grupos.

Em plantas de canga, a análise de enriquecimento funcional mostrou que o grupo em vermelho inclui 63 proteínas envolvidas principalmente no metabolismo energético e na biossíntese de metabólitos secundários. O grupo em verde compreendeu 69 proteínas relacionadas ao ciclo celular e resposta especialmente a estresses abióticos, como ao estresse osmótico. O grupo em azul contém 46 proteínas, incluindo principalmente proteínas de ligação, como proteínas de ligação de ácidos nucleicos, componentes estruturais de ribossomos e dobramento de proteínas. Em plantas de RM, o grupo em vermelho foi composto por 19 proteínas relacionadas aos estímulos abióticos, principalmente em resposta a temperatura. O grupo em verde contém 24 proteínas envolvidas no metabolismo do carbono e na biossíntese de metabólitos secundários. As 26 proteínas incluídas no grupo em azul em plantas de RM

foram categorizadas principalmente em processos celulares, como expressão gênica e processo metabólico de proteínas.

DISCUSSÃO

Neste estudo, as análises dos proteomas revelaram abundâncias diferenciais de proteínas relacionadas às vias metabólicas envolvidas nas respostas aos estresses abióticos e simbiose com microrganismos tanto em plantas crescidas em canga quanto em plantas de RM. No entanto, plantas de canga apresentaram maiores quantidades e diversidade de proteínas com altas abundâncias em relação às plantas de RM (Tabela Suplementar 1). Juntas, as análises mostraram que a abundância e a co-ocorrência de grande parte das proteínas identificadas podem ser críticas para a adaptação da espécie *D. apurensis* em ambientes severos, ao ajudarem a planta a tolerar fatores estressantes como o déficit hídrico, o estresse oxidativo, a privação de nutrientes, especialmente o P, e o excesso de metais, especialmente o Fe.

Os resultados também sugerem que a facilidade de realizar associações com microrganismos simbiotes pode ser uma característica fundamental para o sucesso adaptativo da espécie. A seguir, são destacadas essas proteínas consideradas críticas na tolerância aos estímulos abióticos e associações com microrganismos identificadas neste estudo.

RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO

As proteínas SOD, POD, CAT, GR e MDAR atuam no sistema antioxidante enzimático e constituem um grupo de proteínas essenciais na eliminação de espécies reativas de oxigênio. As proteínas “proline-rich receptor” e “betaine aldehyde dehydrogenases” (BADHs) estão envolvidas no metabolismo da prolina e da glicina betaína, que participam de vias de sinalizações, atuando como antioxidantes não enzimáticos. Os papéis da “Proline-rich receptor” e BADHs serão discutidos mais a frente no tópico sobre déficit hídrico.

Foram identificadas três sequências da proteína “ferritin” (Tabela suplementar 1). Esta proteína atua na remoção de Fe^{2+} do meio celular, evitando reações destrutivas. Sabendo que solos de canga apresentam altas concentrações de ferro (Tabela 1), e que o excesso deste metal no meio celular pode resultar em estresse oxidativo, a importância “Ferritin” na detoxificação

de plantas submetidas a altas concentrações de Fe tem sido consideravelmente reconhecida (Orino *et al.*, 2001).

Maiores níveis de proteínas envolvidas no sistema antioxidante em plantas de canga sugerem que neste ecossistema as plantas estão submetidas a condições de estresses mais severas do que em RM, indicando que a espécie *D. apurensis* evoluiu mecanismos de tolerância para se adaptar a ambientes estressantes.

RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO

Solos de áreas em recuperação apresentam maiores teores de argila em sua composição, enquanto solos de canga são compostos por maiores teores de areia (Tabela 1). Nesse contexto, solos de canga apresentam menor capacidade de retenção de água, contribuindo para a possibilidade de déficit hídrico em plantas estabelecidas neste ecossistema. O déficit hídrico pode ainda ser agravado pelas altas temperaturas da região (Skirycz *et al.*, 2014). Portanto, maiores níveis dessas proteínas em plantas crescidas em canga sugerem um déficit hídrico mais severo nesse ecossistema do que em RM. A espécie *D. apurensis* pode ter desenvolvido mecanismos adaptativos para tolerância ao déficit hídrico devido às características de seu ambiente nativo, podendo ser apta para tolerar possíveis períodos de escassez de água em áreas mineradas em reabilitação ao longo do tempo.

As “aquaporin PIP1-1” e “water-stress induced tonoplast intrinsic protein” desempenham papéis reguladores no transporte celular de água em membranas plasmáticas e tonoplastos, respectivamente (Li *et al.*, 2016). As aquaporinas são essenciais na tolerância das plantas ao déficit hídrico, pois contribuem substancialmente para a absorção de água nas raízes e manutenção do equilíbrio osmótico (Shekoofa *et al.*, 2018; Paudel *et al.*, 2019).

As “proline-rich receptor-like protein” (PERK9) e a “receptor like protein kinase S.2” atuam na fosforilação de proteínas para regulação positiva da via de sinalização do ácido abscísico (ABA). Em longos períodos de escassez de água, o ABA desencadeia uma cascata de sinalização nas células guarda para o fechamento estomático (Goodger *et al.*, 2010; Jarzyniak e Jasiński, 2014; Osakabe *et al.*, 2014; Daszkowska-Golec, 2016). Por outro lado, o processo de abertura e fechamento dos estômatos deve ocorrer de maneira rápida e eficaz (Goodger *et al.*, 2010). Estudos mostraram que em condições de déficit hídrico há também o acúmulo de proteínas do tipo “phosphatase 2C” (PPC2), que atua na desfosforilação de proteínas para regular negativamente a via de sinalização ativada pelo ABA (Singh *et al.*, 2015; Fujioka *et al.*,

2019; Baek *et al.*, 2019). A PPC2 também apresentou maiores níveis em plantas de canga, sugerindo que a eficiência no processo de abertura e fechamento estomático é um mecanismo essencial na tolerância da *D. apurensis* à eventos de seca.

Alto nível da “auxin signaling f-box 2” em plantas de canga pode estar relacionado à modulação das propriedades hidráulicas nas raízes para permitir economia de água em ambientes de seca (Sadok e Schoppach, 2019), pois esta proteína é um receptor de auxina e sua atividade tem sido associada ao aumento da tolerância das plantas a estresses abióticos, incluindo déficit hídrico (Chen *et al.*, 2012; Bu *et al.*, 2014; An *et al.*, 2016; Bielach *et al.*, 2017).

As proteínas “ABC transporter ATP-binding protein y”, “ABC transporter B family member 8” e “ABC transporter I family member 19” são conhecidas como transportadores ABC localizadas em diferentes tecidos ou membranas (Verrier *et al.*, 2008). Estudos têm relacionado os transportadores ABC à resposta ao déficit hídrico em plantas (Goodger *et al.*, 2010; Jarzyniak e Jasiński, 2014; Osakabe *et al.*, 2014). Não se sabe exatamente sobre as funcionalidades em que suas diferentes isoformas atuam. No entanto, sabe-se que mutantes de *Arabidopsis* com deficiência na biossíntese de transportadores ABC apresentam menor tolerância à privação de água (Jarzyniak e Jasiński, 2014), sugerindo seu envolvimento na tolerância ao déficit hídrico em outras espécies vegetais como a *D. apurensis*.

Sobre a BADH, é uma enzima essencial também na biossíntese de glicina betaína (GB) a partir da oxidação da betaína aldeído (Hashemi *et al.*, 2018). A relação da superexpressão para a biossíntese de BADH com o aumento no nível de GB e maior tolerância ao déficit hídrico já foi observada em diferentes espécies de plantas, como *Arabidopsis thaliana* (Yang *et al.*, 2015; Hashemi *et al.*, 2018), *Sesuvium portulacastrum* (Yang *et al.*, 2015), *Suaeda corniculata* (Wang *et al.*, 2016) e *Zeya mays* (Zhang *et al.*, 2012). Os aumentos da expressão para a síntese de BADH e nos níveis de GB também têm sido relacionados ao aumento no acúmulo de prolina (Giri, 2011; Fan *et al.*, 2012; Hashemi *et al.*, 2018). Fan *et al.* 2012 sugerem que o acúmulo de prolina ocorre devido à maior quantidade de NAD (P) H formado após a conversão de betaína aldeído em GB. Na biossíntese de prolina, a oxidação de NAD (P) H a NAD (P) ocorre novamente. No entanto, ainda faltam evidências diretas indicando as interações que ocorrem entre BADH, GB e prolina em resposta ao estresse hídrico.

A “proline-rich receptor-like protein kinase PERK9” foi relatado como uma das respostas mais comuns ao déficit hídrico (Yang *et al.*, 2019). Elas são consideradas componentes

essenciais da membrana celular em diferentes órgãos vegetais, onde desempenham seus papéis em cascatas de transdução de sinal em resposta a estresses ambientais (Bai *et al.*, 2009; Kishor *et al.*, 2015). No entanto, o papel específico da PERK9 identificada com maior abundância em plantas de canga permanece desconhecido.

A “spermidine synthase 2” é uma enzima chave na biossíntese de espermidina, que é um dos compostos de poliamina mais comuns e abundantes nas plantas, sendo relacionada ao aumento da tolerância ao déficit hídrico (Hashemi *et al.*, 2018; Satish *et al.*, 2018). A espermidina também está envolvida na indução do fechamento e abertura dos estômatos (Alcázar *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2010).

RESPOSTA AO EXCESSO DE METAIS NO SOLO

Os solos de canga apresentaram maiores níveis de Fe (Tabela 1). Esse fator é considerando um dos maiores influenciadores no estabelecimento nesses ambientes. Altos níveis de metais na solução do solo podem ativar vias de sinalização distintas, como dependente de cádmio, proteína quinase ativada por mitógeno, ROS e fitohormônios, aumentando a expressão de fatores de transcrição ou genes responsivos a este estresse (Tiware e Lata, 2018). A maioria dessas proteínas foram identificadas em plantas crescidas nos dois ecossistemas, com maiores abundâncias em raízes de plantas de canga.

As proteínas quinases receptoras estão envolvidos na resposta a estresse em plantas, onde são capazes de ativar várias redes de sinalização (Jalmi *et al.*, 2018), bem como proteínas quinases ativadas por mitógenos (“mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3”, Tabela Suplementar 1) (Jalmi e Sinha, 2015). Semelhante a esses resultados, as calmodulinas e proteínas quinases dependentes de cálcio (“calcium-dependent protein kinase” e “calcium-dependent protein kinase 2”) foram descritas como proteínas com papel fundamental nas respostas a estresses por metais ao regular vias de sinalização que contribuem para melhorar a tolerância de plantas em substratos com excesso de metais (Chakrabarty *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2015; Jalmi *et al.*, 2018). Estes resultados podem estar diretamente relacionados à presença de metais nas raízes, semelhante a estudos recentes que mostram que essas proteínas contribuem para o movimento de alguns metais em *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum* e *Beta vulgaris* (Erbasol *et al.*, 2013; Migocka *et al.*, 2015; Vatansever *et al.*, 2017).

Proteínas relacionadas à glutathione (“glutathione reductase”) estão envolvidas na tolerância ao estresse por metais pesados em plantas (Yadav, 2010). Além disso, foram identificadas diversas proteínas de “heat shock proteins” com maiores níveis principalmente em plantas de canga. Estes resultados concordam com Jiang *et al.* (2020), que relataram a contribuição das “heat shock proteins” à tolerância ao estresse por metais pesados em *Rosa hybrida*. Além disso, as proteínas identificadas e relacionadas ao metabolismo da auxina podem modificar o crescimento radicular e induzir várias modificações metabólicas que contribuem para aliviar a toxicidade induzida por metais pesados (Wang *et al.*, 2015).

Neste estudo a proteína "nicotianamine synthase" apresentou maior abundância em plantas de RM, porém sem diferença estatística entre as plantas crescidas nos dois ambientes (Tabela Suplementar 1). Esta enzima é essencial na via biosintética do ácido mugínico para formar fitosideróforos que agem como quelantes rizosféricos de ferro férrico, podendo atuar também como quelantes intracelulares para diminuir a superacumulação de ferro dentro dos compartimentos celulares (Stein *et al.*, 2009).

A “ferritin” foi uma proteína comum a plantas crescidas em ambos os ambientes, com maior abundância em plantas de canga (Tabela Suplementar 1). Nas células radiculares, o espaço apoplástico e os vacúolos desempenham um papel fundamental na armazenagem de ferro livre (Briat e Lobréaux, 1997). A funcionalidade desta proteína foi descrita anteriormente, mostrando seu papel fundamental no sequestro citoplasmático de alta quantidade de ferro solúvel para armazenar nos vacúolos (Stein *et al.*, 2009; Shevyakova *et al.*, 2011). Portanto, sua atividade pode contribuir para a diminuição dos efeitos negativos do ferro em *D. apurensis* principalmente em solos de canga.

ESTRESSE POR ESCASSEZ DE FÓSFORO

Análises dos perfis proteicos em diferentes espécies vegetais submetidas à escassez de P têm mostrado a abundância diferencial de proteínas relacionadas principalmente ao metabolismo de carboidratos, transdução de sinal, regulações da expressão gênica, síntese de proteínas, e defesa, como aquelas relacionadas à síntese de metabólitos secundários e mitigação do estresse oxidativo (Kim *et al.*, 2011; Muneer e Jeong, 2015). De acordo com esses estudos, essas proteínas contribuem para a maior tolerância de plantas à escassez de P.

Entre as proteínas do metabolismo de carboidratos com altos níveis especialmente em plantas de canga estão principalmente as envolvidas na rota glicolítica, como “fructose-1,6-bisphosphatase”, “fructose-bisphosphate aldolase” e “glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”, e no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), como a enzima “malate dehydrogenase” (Tabela Suplementar 1), que também foram identificadas com níveis aumentados em outros estudos com plantas em privação de P (Alexova e Millar, 2013).

Além de proteínas envolvidas na produção de energia via metabolismo aeróbico, também foram identificadas “alcohol dehydrogenases” (ADHs), que possibilitam a manutenção do metabolismo energético por fermentação em condição de anaerobiose. Duas ADHs apresentaram abundâncias diferenciais significativas em plantas de canga e apenas uma em plantas de RM (Tabela Suplementar 1). O aumento no acúmulo de ADH está de acordo com os resultados observados em outros estudos com diferentes espécies de plantas sob escassez de P (Fukuda *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Chevalier e Rossignol, 2011; Alexova e Millar, 2013). Assim, proteínas dos metabolismos glicolítico e fermentativa atuam juntamente com sinalizações induzidas pelos produtos do metabolismo antioxidante para induzir o aumento do volume do sistema radicular e eficiência na aquisição e no uso de fósforo em plantas submetidas a esse tipo de estresse.

Os mecanismos desencadeados na resposta ao estresse por escassez de P ocorrem de forma dinâmica, onde os níveis de expressão de diferentes genes e abundância de proteínas variam no decorrer do tempo de exposição ao estresse (Alexova e Millar, 2013). Os autores sugerem que isso se deve a necessidade do uso de metabólitos que serão utilizados em um reabastecimento anaplerótico para a manutenção de energia durante o estresse. Este comportamento onde proteínas dos dois metabolismos estão com níveis altos foi observado no último ponto de análise da linha de tempo experimentada em raízes de arroz (Fukuda *et al.*, 2007; Alexova e Millar, 2013).

A “26S proteasome regulatory subunit 4” abundante em plantas de canga pode estar relacionada ao crescimento de raízes laterais. Estudos mostraram que alterações no proteoma de plantas em privação de P inclui o acúmulo de polipeptídeos como subunidades do proteossoma 26S e ubiquitinas, que estão envolvidos na degradação de proteínas (Li *et al.*, 2008; Chevalier e Rossignol, 2011; Alexova e Millar, 2013). A degradação de proteínas possivelmente ocorre em diversos tecidos com o objetivo principal de fornecer aminoácidos às raízes em crescimento (Alexova e Millar, 2013).

A formação de ROS também deve atuar essencialmente na sinalização para indução da expressão gênica para biossínteses de proteínas envolvidas em adaptações para a escassez de P (Tyburski *et al.*, 2009; Muneer e Jeong, 2015). Em ambos os ecossistemas as raízes das plantas apresentaram fatores de transcrição de expressão comumente relatados sob escassez de fosfato, incluindo MYB e HLH (Tabela Suplementar 1), que regulam a expressão de genes-alvo em respostas à escassez de P (Zhou *et al.*, 2008; Aleksza *et al.*, 2017). Tais resultados concordam com Gho *et al.* (2018), que mostraram regulação positiva de genes relacionados a esses fatores de transcrição em raízes de arroz sob escassez de P. Portanto este resultado pode também está relacionado à escassez de P em solos de canga, podendo contribuir para o estabelecimento da *D. apurensis* em ambientes com deficiência de nutrientes.

Fungos micorrízicos também podem induzir a expressão de transportadores de P de alta afinidade na membrana plasmática das raízes de plantas sob escassez de P (Tran *et al.*, 2010b; Yu *et al.* 2019). Entre os transportadores mais importantes, estão as “acidic phosphatases”. Nesse contexto, o aumento da “acidic phosphatase” pode estar relacionado à baixa disponibilidade de P em solos de canga. Em solos ácidos e ricos em Fe, como ocorrem em canga (Tabela 1), o P pode formar complexos com óxidos de ferro, Fe^{2+} ou Fe^{3+} , apresentando-se em uma forma inacessível para a absorção pelas raízes (Tran *et al.*, 2010b). Nessas condições é necessário que sejam liberados ácidos orgânicos que irão quelar fosfato complexados. As fosfatases ácidas podem estar relacionadas com a liberação de ácidos orgânicos.

Foram identificadas também duas “purple acid phosphatase” extracelulares e uma “phosphate transporter” (PHO1-3), sendo que as duas primeiras apresentaram maiores níveis em plantas de canga, enquanto a última foi mais abundante em plantas de RM (Tabela Suplementar 1). Essas proteínas pertencem a um grupo de hidrolases induzíveis por privação de P em plantas, onde atuam na reciclagem de P de ésteres e anidridos (Tran *et al.*, 2010b). A regulação positiva da atividade de isoenzimas do tipo “purple acid phosphatase” já foi observada em diferentes tecidos de plantas em condição de escassez de P (Li *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2010b), ocorrendo em diferentes espécies como *Arabidopsis thaliana* (Tran *et al.*, 2010b), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Bozzo *et al.*, 2006), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Lung *et al.*, 2008) e espécies que, assim como a *D. apurensis*, pertencem a família Fabaceae, como tremoço (*Lupinus albus*) (Miller *et al.*, 2001) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Liang *et al.*, 2010).

Três sequências de “phospholipase D alpha” foram mais abundantes em plantas de canga (Tabela Suplementar 1). A indução de fosfolipases tem sido observada em estudos com plantas

durante a privação de P (Tjellström *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2020), onde estariam envolvidas na reserva de P e indução do crescimento das raízes (Lin *et al.*, 2020). Já o papel da “S-adenosylmethionine synthetase” foi relacionado à homeostase de P durante a escassez (Alexova e Millar, 2013). Essas proteínas são doadoras de metil para a biossíntese de flavonoides e poliaminas (Amir, 2010). Dessa forma, os resultados sugerem que essas proteínas podem contribuir para a tolerância da *D. apurensis* nos ecossistemas de canga ao possibilitar o alcance das raízes a um maior volume do solo e maior eficiência no uso de P.

De acordo com os resultados, os teores de P em solos de RM podem ser considerados próximo do adequado ($19,5 \text{ mg dm}^{-3}$), enquanto solos de canga apresentam teores baixos (1 mg dm^{-3}). A deficiência de P em canga pode ser devido a uma drenagem deficiente no solo e formação de complexos entre P e outros minerais. Em solos de RM, o P apresenta teor elevado devido a adequação química (Zappi *et al.*, 2018). No geral, esses resultados estão de acordo com o observado por Ramos *et al.* (2019a) em estudo onde a *D. apurensis* apresentou boa performance em substratos com depleção de nutrientes. Portanto a espécie *D. apurensis* pode ter desenvolvido mecanismos moleculares para se desenvolverem em solos com baixos teores de nutrientes, incluindo o P, visto que este é um dos nutrientes menos disponíveis em solos de canga (Skirycz *et al.*, 2014; Guedes *et al.*, 2021; Gastauer *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2022).

PROTEÍNAS ASSOCIADAS À SIMBIOSE EM PLANTAS

Foram identificadas as abundâncias de diversas proteínas envolvidas no estabelecimento de simbiose com bactérias e fungos, incluindo nodulinas (Sakamoto *et al.*, 2019), monodesidroascorbato redutase (Vadassery *et al.*, 2009) e enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutationa (Luo *et al.*, 2020). Sakamoto *et al.* (2019) relataram que as nodulinas podem ter um papel positivo no estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular, bem como na fixação biológica de N. Da mesma forma, estudos recentes descreveram as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa como cruciais para manter a capacidade antioxidante e a interação mutualística de plantas com fungos ou simbiose de nódulos radiculares (Vadassery *et al.*, 2009; Noshi *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2020). Vadassery *et al.* (2009) e Svistoonoff *et al.* (2010) também relataram um papel positivo da nodulina e monodesidroascorbato redutase no estabelecimento da simbiose em *Arabidopsis thaliana* e *Medicago truncatula*, respectivamente.

Solos de áreas em recuperação são caracterizados por conter baixo teor de nutrientes e de matéria orgânica devido a retirada da vegetação e do solo na atividade de mineração (Ramos *et al.*, 2019a). Essa baixa disponibilidade de matéria orgânica em solos de RM em comparação a solos de canga também pode ser observada em nossos resultados (Tabela 1). Assim, a introdução desta espécie para revegetação de áreas mineradas deve contribuir para a manutenção de processos essenciais do solo, como a fixação de nitrogênio durante a reabilitação (Nunes *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2019a).

Nesse contexto, os níveis mais altos de proteínas relacionadas à simbiose nas raízes de plantas de canga do que em plantas de RM são explicados pela maior diversidade de espécies vegetais encontradas nos ecossistemas de canga e seu efeito correspondente nas comunidades microbianas do solo.

CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que *D. apurensis* crescendo em canga nativa possui um conjunto de proteínas para lidar com os desafios dos estresses abióticos. Dentre elas, estão proteínas envolvidas no sistema antioxidante, resposta ao déficit hídrico, excesso de metais e deficiência de P. Os proteomas também sugerem que esta espécie também possui alta capacidade de se associar com microrganismos do solo. Estas características aumentam a probabilidade do estabelecimento de *D. apurensis* em áreas mineradas em reabilitação. Altos níveis de proteínas envolvidas em resposta a condições ambientais severas e interação com microrganismos na rizosfera são características que podem apoiar o estabelecimento da *D. apurensis* e de outras espécies nativas na revegetação de áreas mineradas em reabilitação.

4. CAPÍTULO II: PROTEÔMICA EM RAÍZES DE *Mimosa acutistipula* FORNECE INFORMAÇÕES SOBRE MECANISMOS DE RESPOSTA A ESTRESSE EM PLANTAS CRESCIDAS EM MINAS DE FERRO NA AMAZÔNIA ORIENTAL

RESUMO

Mimosa acutistipula é endêmica do Brasil e cresce em afloramentos ferruginosos, conhecidos como canga, na Serra dos Carajás, Amazônia oriental, onde está localizado um dos maiores depósitos de minério de ferro do mundo. As plantas que se desenvolvem nesses ecossistemas estão sujeitas às condições ambientais severas e devem apresentar mecanismos adaptativos para crescerem e prosperarem. *Mimosa acutistipula* é uma das espécies nativas de canga utilizadas para restaurar a biodiversidade em áreas mineradas em reabilitação. Compreender os mecanismos moleculares envolvidos na adaptação em canga é essencial para deduzir a capacidade de adaptação dessas espécies diante de possíveis fatores estressantes em áreas mineradas em reabilitação ao longo do tempo. Neste estudo, os perfis proteômicos radiculares de plantas de *Mimosa acutistipula* crescidas em um ecossistema de canga nativo e em áreas mineradas em reabilitação foram comparados para identificar proteínas essenciais envolvidas na adaptação desta espécie em seu ambiente nativo e que devem favorecer seu estabelecimento em áreas mineradas. Os resultados mostraram que 436 proteínas com valores significativos ($p < 0,05$) e “fold change” ≥ 2 foram mais abundantes em raízes de plantas de canga e 145 mais abundantes nas raízes de plantas de áreas em reabilitação. Dentre elas, uma quantidade e diversidade representativa de proteínas foram relacionadas às respostas ao déficit hídrico, ao calor e às respostas aos íons metálicos. Outras proteínas identificadas estão envolvidas na atividade de biocontrole contra fitopatógenos e simbiose. Esta pesquisa fornece conhecimento sobre proteínas envolvidas em respostas da *Mimosa acutistipula* aos estímulos ambientais, sugerindo mecanismos críticos para apoiar o estabelecimento de plantas nativas de canga em áreas mineradas em reabilitação ao longo do tempo.

Palavras-chave: canga, reabilitação de áreas mineradas, proteômica de plantas, simbiose, estresse abiótico

ABSTRACT

Mimosa acutistipula is endemic to Brazil and grows in ferruginous outcrops, known as *canga*, in Serra dos Carajás, eastern Amazon, where one of the largest iron ore deposits in the world is located. Plants that develop in these ecosystems are subject to severe environmental conditions and must have adaptive mechanisms to grow and thrive in *cangas*. *Mimosa acutistipula* is one of the native *canga* species used to restore biodiversity in post-mining areas. Understanding the molecular mechanisms involved in adaptation in *canga* is essential to deduce the ability of these species to adapt to possible stressors in rehabilitating minelands over time. In this study, the root proteomic profiles of *Mimosa acutistipula* grown in a native *canga* ecosystem and rehabilitating minelands were compared to identify essential proteins involved in the adaptation of this species in its native environment and that should enable its establishment in rehabilitating minelands. The results showed that 436 proteins with significant values ($p < 0.05$) and fold change ≥ 2 were more abundant in *canga* and 145 in plant roots from the rehabilitating minelands. Among them, a representative amount and diversity of proteins were related to responses to water deficit, heat and responses to metal ions. Other identified proteins are involved in biocontrol activity against phytopathogens and symbiosis. This research provides insights into proteins involved in *Mimosa acutistipula* responses to environmental stimuli, suggesting critical mechanisms to support the establishment of native *canga* plants in rehabilitating minelands over time.

Keywords: *canga*, rehabilitating minelands, plant proteomics, symbiosis, abiotic Stress

INTRODUÇÃO

A mineração de ferro na Amazônia oriental ocorre em um dos “hotspots” de biodiversidade mais significativos do mundo, onde está localizada a Província Mineral de Carajás (dos Santos e Milanez, 2015). As jazidas de minério de ferro da Província Mineral de Carajás estão localizadas em savanas ferríferas, conhecidas como cangas (Jacobi *et al.*, 2007; dos Santos e Milanez, 2015), onde a extração de minério de ferro ocorre principalmente em minas a céu aberto, transformando paisagens e alterando propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Gastauer *et al.*, 2018; Feng *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2022). Essas mudanças sublinham a perda de serviços ecológicos que afetam a biodiversidade e a sustentabilidade das áreas nativas (Marques *et al.*, 2011). Nesse contexto, a reabilitação de áreas mineradas é necessária para reduzir a perda de biodiversidade (Gastauer *et al.*, 2021).

Estratégias de reabilitação de áreas mineradas foram estabelecidas com foco na triagem e uso de plantas nativas com capacidade de se adaptarem a esses ecossistemas (Jacobi *et al.*, 2007; Skirycz *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2015; Giannini *et al.*, 2017). *Mimosa acutitipula* var. *ferrea* Barneby (Fabaceae) é considerada uma das espécies nativas com alto desempenho na reabilitação de áreas mineradas (Silva *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019b; Carvalho *et al.*, 2021) devido a sua disponibilidade de sementes, altas taxas de germinação, eficiência no uso de nutrientes e interações não específicas com microrganismos do solo (Silva *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2021). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares adaptativos desenvolvidos por esta espécie ao longo de sua história evolutiva que suportam o seu crescimento nesses ecossistemas ou mesmo em ambientes nativos.

Nos últimos anos, a proteômica se tornou uma ferramenta poderosa para estudar processos ambientais, incluindo controle biológico, tolerância aos estresses abióticos, doenças de plantas, metabolismo de fitohormônios e promoção do crescimento (Berka *et al.*, 2020; Mattarozzi *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Estudos recentes demonstraram que a proteômica pode ser uma ferramenta valiosa para explorar o metabolismo de espécies florestais que crescem em ecossistemas severos (Herrera *et al.*, 2018; Nascimento *et al.*, 2022). Através desta ferramenta é possível identificar proteínas críticas envolvidas nas respostas aos estresses ambientais e que devem contribuir para o estabelecimento de plantas em canga. Em posse dessas informações, podem ser deduzidas as capacidades de adaptações dessas espécies diante de possíveis fatores estressantes em áreas mineradas em reabilitação. Assim, este estudo visa identificar proteínas críticas nas respostas aos estresses ambientais apresentadas em altos níveis nas raízes de *M.*

acutistipula crescidas em canga e que podem apoiar o estabelecimento desta espécie em áreas mineradas em reabilitação.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAGEM DAS RAÍZES E ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS

Raízes de plantas de *Mimosa acutistipula* foram amostradas de canga arbustiva nativa livre de atividade antrópica e distante das zonas em mineração (60° 00' 41.0" S 50° 17' 45.0" W) e de pilhas de estéril de uma área minerada em reabilitação (60° 20' 32.0" S 50° 07' 04.0" W) na Serra dos Carajás, Pará, Brasil. O programa de reabilitação da área de mineração teve início em 2014, onde as sementes nativas foram dispersadas com hidrossemeadura contendo adubação NPK (04-14-08) e matéria orgânica. Raízes (profundidade de 5 a 30 cm) de quatro indivíduos diferentes foram coletadas, mantidas em tampão fenol/SDS frio e transportadas para o laboratório.

As raízes de cada planta (3g de cada) foram submetidas a um protocolo padrão de extração de proteínas de tecidos vegetais (Wang *et al.*, 2006), com modificações (Nascimento *et al.* 2018). O material foi macerado em nitrogênio líquido. Em seguida, 10 ml de um tampão contendo 1,5 M de sacarose, 1,5 M de tris-HCL pH 8, 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 100 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), polivinilpolipirrolidona (PVPP), água ultrapura, 100 µL de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 500 µL de β-mercaptoetanol foram adicionados a cada amostra. As amostras foram então sonicadas cinco vezes por 30 segundos em temperatura ambiente. Os extratos foram divididos em dez microtubos e foram adicionados 700 µl de fenol por microtubo, seguido por agitação no vórtex por 15 minutos e centrifugadas por 8 minutos a 14.000 rpm para permitir a separação das fases fenólicas. A fase fenólica foi transferida para um novo microtubo e repetida para eliminar qualquer fase aquosa ou resíduo de SDS. Foram adicionados 1,3 ml de acetato de amônio 100 mM a cada microtubo e as proteínas foram precipitadas por 24 horas a -80 °C. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 8 min, e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados foram transferidos para novos microtubos e lavados com acetona 80% por quatro vezes. A última etapa de lavagem foi realizada com etanol 70% e secos em um concentrador a

temperatura ambiente por 7 min. Por fim, os extratos foram solubilizados em 200 μL de RapiGest 0,2% (Waters, Milford, MA, EUA).

Foram digeridas 50 μg de proteínas de cada amostra. A preparação para digestão foi realizada com a adição de RapiGest (0,1%) (Waters, Milford, MA, USA) na proporção de 1:1, seguida pela adição de ditioneitol (DTT, 5 mM), por 25 minutos à 56 °C, e iodoacetamida (IAA, 14 mM) por 30 minutos à temperatura ambiente. Uma nova adição de DTT (5 mM) foi realizada, aguardando-se mais 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, seguido pela adição de CaCl_2 (1 mM). O tratamento com tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade V5280, Promega, Madison, WI) à 20 ng μL^{-1} foi realizado por 20 horas à 37 °C. Foi adicionado ácido trifluoroacético (TFA) na concentração final de 0,4% do volume da amostra a fim de parar a reação da tripsina. Após esses procedimentos, o pH das amostras foi elevado para 10, utilizando-se hidróxido de amônio (NH_4OH).

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANÁLISE DOS DADOS

A identificação e quantificação das proteínas foram realizadas em sistema “Waters Xevo TQ MS with Acquity UHPLC”. Cinco microgramas dos peptídeos de cada amostra foram analisados em cinco réplicas analíticas. A primeira dimensão usou uma coluna de aprisionamento XBridge BEH130 C18 de 5 μm (300 μm x 50 mm) e Symmetry C18 5 μm (180 μm x 20 mm) a uma taxa de fluxo de 2000 $\mu\text{L min}^{-1}$. A segunda dimensão usou uma coluna analítica de 1,7 μm BEH130 C18 1,8 μm (100 μm x 100 mm), a uma taxa de fluxo de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$. As amostras foram separadas em cinco frações com gradiente de 10.8, 14.0, 16.7, 20.4 e 65,0% de acetonitrila. A aquisição variou de 50 a 2.000 Da.

Os dados foram processados no software Progenesis QI (Waters) para identificação e quantificação, utilizando o banco de dados Viridiplantae do UniProt (UniProtKB/swiss-prot, uniprot.org). A identificação de proteínas foi aceita se a probabilidade de identificação de peptídeos fosse maior que 90% e a de proteínas com 95%. Os níveis de significância das abundâncias diferenciais de proteínas foram determinados pela aplicação do teste ANOVA considerando $p < 0,05$.

As proteínas com a abundância diferencial de raízes de *M. acutistipula* de canga e de área em reabilitação com $p < 0,05$ e “fold change” (FC) ≥ 2 foram comparadas usando uma análise de componentes principais (PCA) no software R v3.6.3 (R Core Team 2018; <https://www.R->

project.org), com os pacotes FactoMineR, Factoshiny e Factoextra. “Heatmaps” também foram desenvolvidos com os valores de intensidades dessas proteínas utilizando o software R v.3.6.3 (pacote pheatmap v.1.0.12, ggplot2 v.3.3.5, colorspace 2.0-2 e grid 4.0.4). Análises de Gene Ontology foram realizadas no OmicsBox v1.2.4 (bioBam) com banco de dados do Uniprot (UniProtKB/swiss-prot, uniprot.org). A análise de enriquecimento da via da Enciclopédia Kyoto de Gene e Genoma (KEGG) foi realizada no KOBAS v3.0. (Mao *et al.*, 2005) (kobas.cbi.pku.edu.cn) utilizando o banco de dados da *Arabidopsis thaliana*. O gráfico para visualização das vias enriquecidas foi desenvolvido no R v.3.6.3 com os pacotes pheatmap v.1.0.12, ggplot2 v.3.3.5, colorspace 2.0-2 e grid 4.0.4.

RESULTADOS

Foram identificadas 3.231 proteínas nas raízes de *M. acutistipula* (Tabela Suplementar 1), sendo 2.530 mais abundantes nas raízes de plantas da canga e 701 mais abundantes nas raízes de plantas de área minerada em reabilitação (RM) (Figura 1A). Após aplicar o filtro considerando $p < 0,05$ e $FC \geq 2$, um total de 436 proteínas com abundâncias diferenciais foram significativas nas plantas de canga e 145 nas plantas de RM (Figura 1B, Tabela Suplementar 1). Todas as proteínas com abundâncias significativas foram identificadas em amostras de ambos os ambientes. Para verificar se os proteomas exercem influências nas amostras dos diferentes ambientes, foi realizada uma PCA, onde pode ser observada a separação das amostras dos diferentes ambientes (Figura 1C). O resultado da PCA sugere que, mesmo essas proteínas estando presentes nas amostras dos dois ambientes, a diferença de abundância pode estar sendo influenciada pelas características das áreas onde as plantas foram crescidas. Amostras de canga formaram um grupo mais aproximado, enquanto as amostras de RM apresentaram maior afastamento entre si.

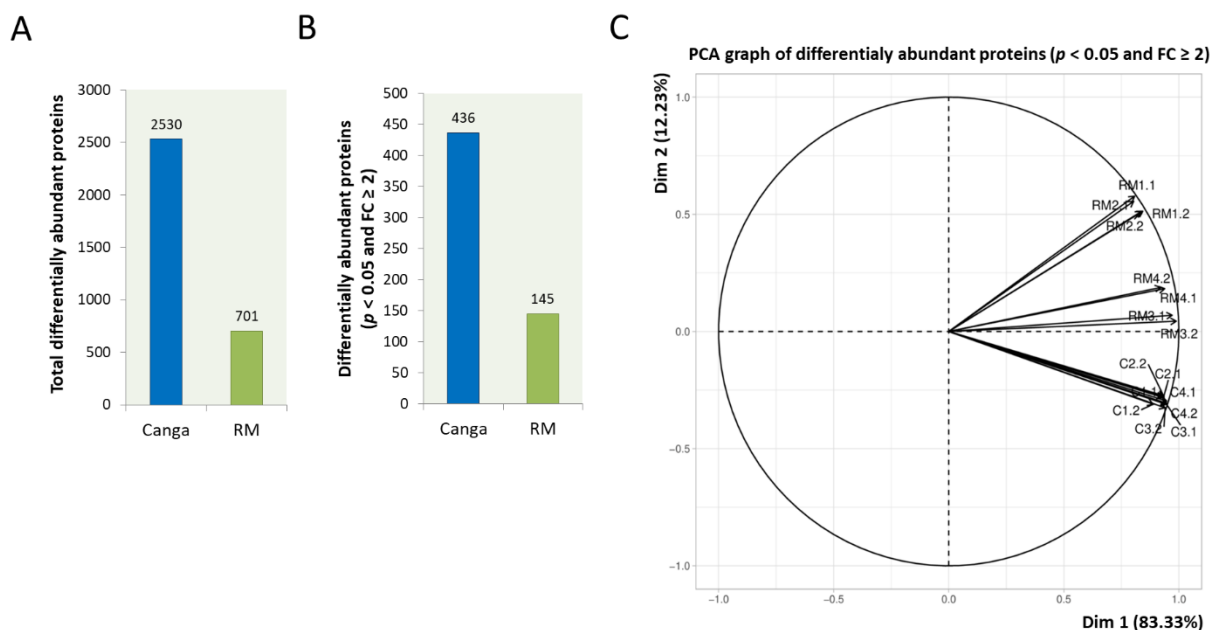


Figura 1 – Quantidade de proteínas diferencialmente abundantes e PCA dos proteomas de raízes de *M. acutistipula* amostradas em canga e em área minerada em reabilitação (RM). A) Total de proteínas mais abundantes nas raízes de cada ambiente. B) Proteínas mais abundantes nas raízes de plantas de cada ambiente considerando $p < 0,05$ e “fold change” ≥ 2 . C) PCA de proteínas mais abundantes em cada ambiente com valor de $p < 0,05$ e “fold change” ≥ 2 comparando réplicas de raízes de RM (RM1. 1, RM1.2, RM2.1, RM2.2, RM3.1, RM3.2, RM4.1 e RM4.2) e canga (C1.1, C1.2, C2.1, C2.2, C3.1, C3.2, C4.1 e C4.2). As proteínas utilizadas nas análises são apresentadas na Tabela Suplementar 1.

As proteínas mais abundantes identificadas nas raízes das plantas de RM foram atribuídas a 48 categorias de processos biológicos, enquanto as proteínas das plantas de canga foram atribuídas a 37 categorias (Figura 2A), em ambas incluindo proteínas envolvidas em respostas aos estímulos abióticos e bióticos. Apesar da identificação de categorias exclusivas em plantas de RM, as proteínas atribuídas a esses processos também foram incluídas em outros termos comuns às plantas de ambos os ambientes. Portanto não foram constituídas de proteínas exclusivas em plantas de RM.

Dentre os processos em que as proteínas envolvidas nas respostas aos estímulos abióticos foram atribuídas, destacam-se as de respostas a privação de água, a temperatura (calor e frio), ao estresse salino e aos íons metálicos (Figura 2B). Proteínas envolvidas nas respostas aos estímulos bióticos foram atribuídas às respostas aos vírus, as bactérias e aos fungos, incluindo processos biológicos envolvidos em associações com simbiontes (Figura 2C). As análises de enriquecimento mostraram que proteínas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários

compõem uma das categorias mais representativas, onde foram incluídas proteínas críticas nas respostas aos estímulos abióticos e bióticos em plantas de ambos os ambientes (Figura 1D).

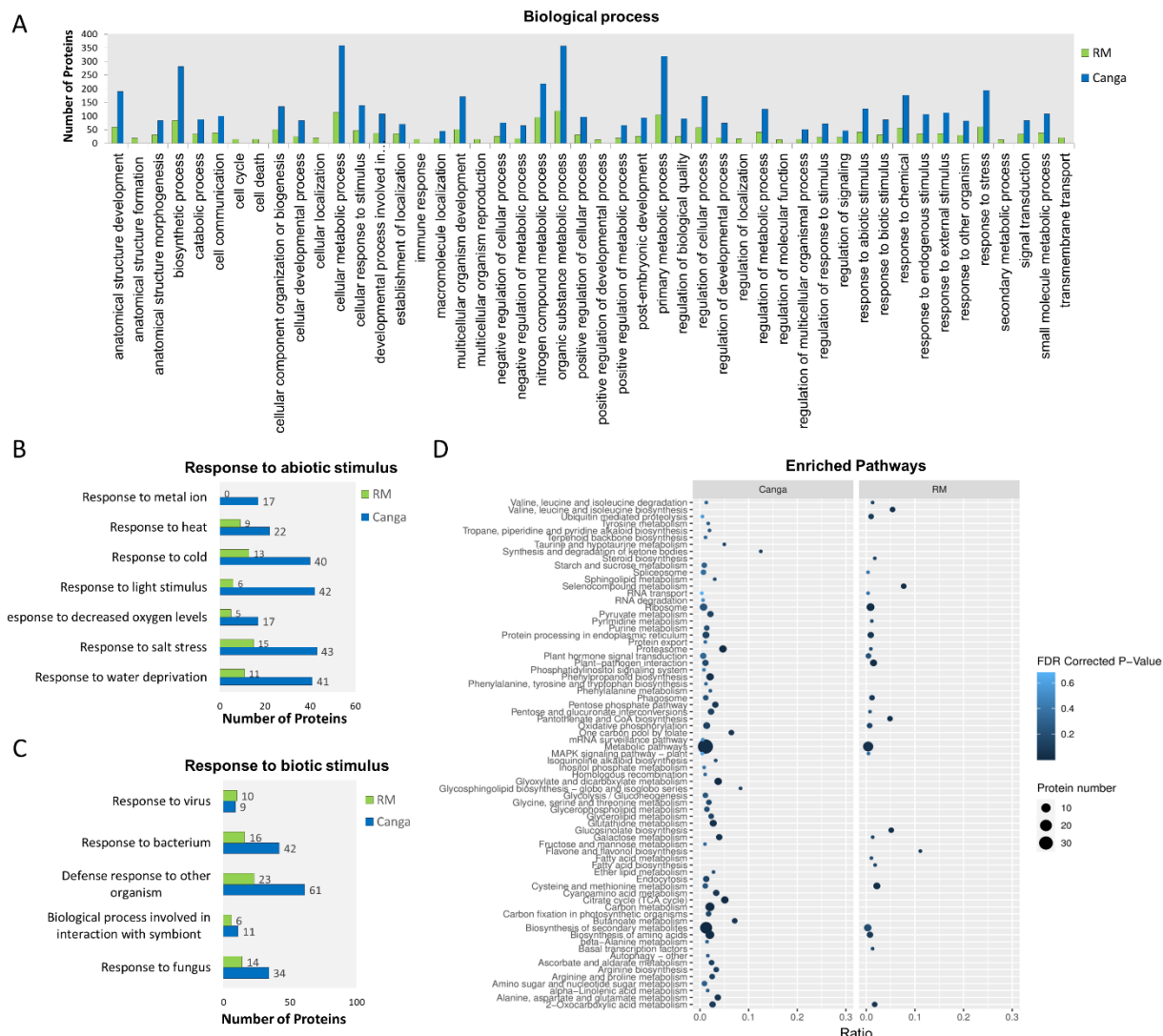


Figura 2 - Anotação de Gene Ontology (GO) e análise de enriquecimento das vias de proteínas com abundâncias diferenciais em *M. acutistipula* amostradas de RM e canga. A) Anotação mostrando os termos GO nas categorias de Processos Biológicos de proteínas mais abundantes em plantas de RM e de canga. B) Subgráfico do termo Resposta ao estímulo abiótico. C) Subgráfico do termo Resposta ao estímulo biótico. D) Análise da Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas (KEGG) das proteínas mais abundantes em raízes de plantas de RM e de canga nas categorias de Processos Biológicos.

“Heatmaps” foram desenvolvidos com as proteínas mais representativas de resposta aos estímulos abióticos (Figura 3) e bióticos (Figura 4), considerando também possíveis influências das características dos ambientes. Os agrupamentos hierárquicos separaram em dois grupos bem definidos as proteínas mais abundantes em raízes de plantas de canga ou de RM de acordo

com os padrões de intensidades das proteínas identificadas em cada uma (Eixo vertical). A maioria das réplicas das amostras de plantas de RM e de canga também foram agrupadas separadamente pelas suas semelhanças nos valores de intensidade das proteínas (Eixo horizontal).

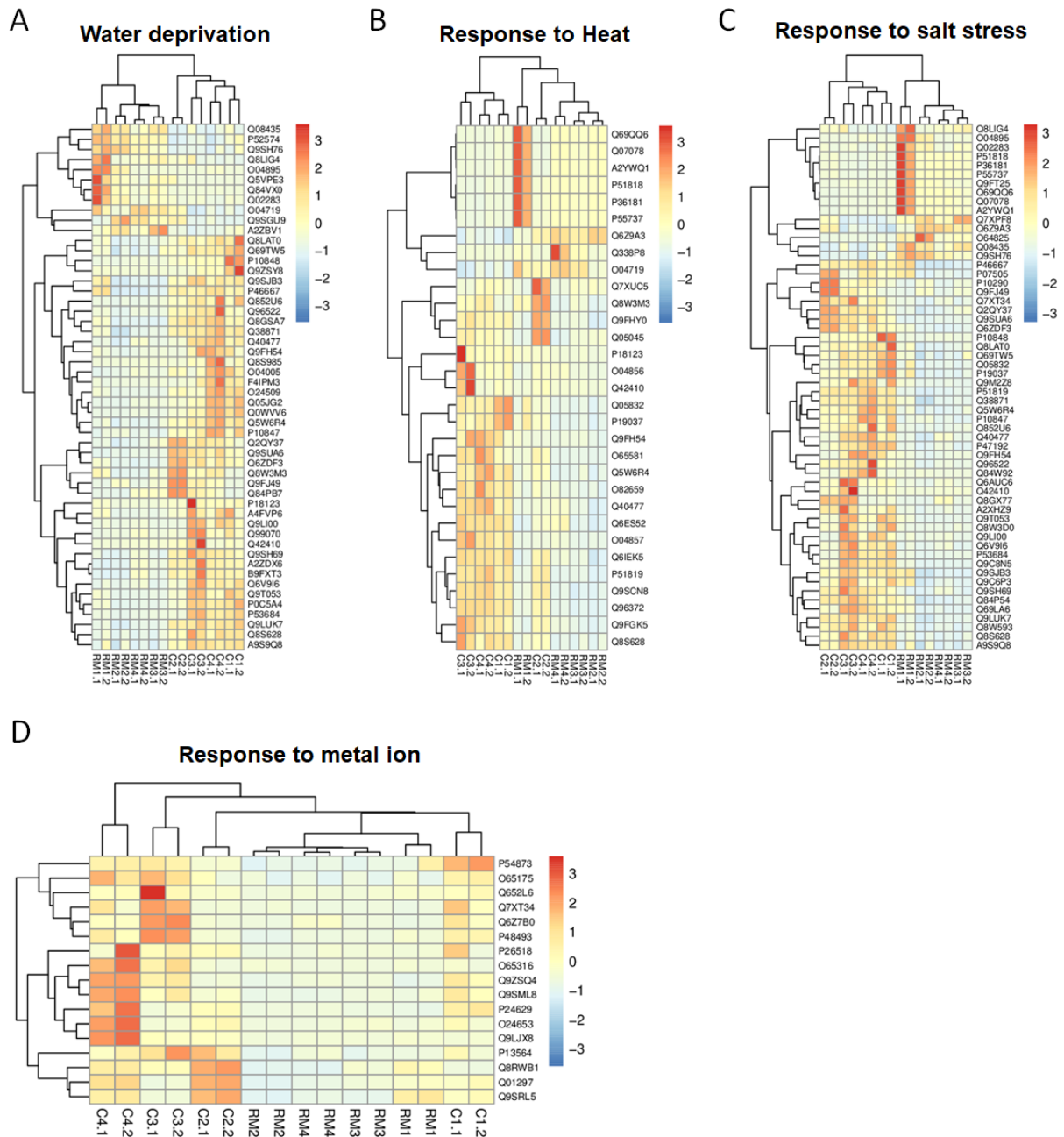


Figura 3 - Agrupamento hierárquico de proteínas diferencialmente abundantes relacionadas aos estímulos abióticos identificadas nas raízes de *M. acutistipula* amostradas de RM (RM1.1, RM1.2, RM2.1, RM2.2, RM3.1, RM3.2, RM4.1 e RM4.2) e de canga (C1.1, C1.2, C2.1, C2.2, C3.1, C3.2, C4.1 e C4.2). A) “Water deprivation”. B) “Response to heat”. C) “Response to salt stress”. D) “Response to metal ion”. As cores vermelha e azul

representam os valores de maior e menor intensidade, respectivamente. Os números de acessos representam as proteínas utilizadas para as análises e podem ser visualizadas na Tabela Suplementar 1.

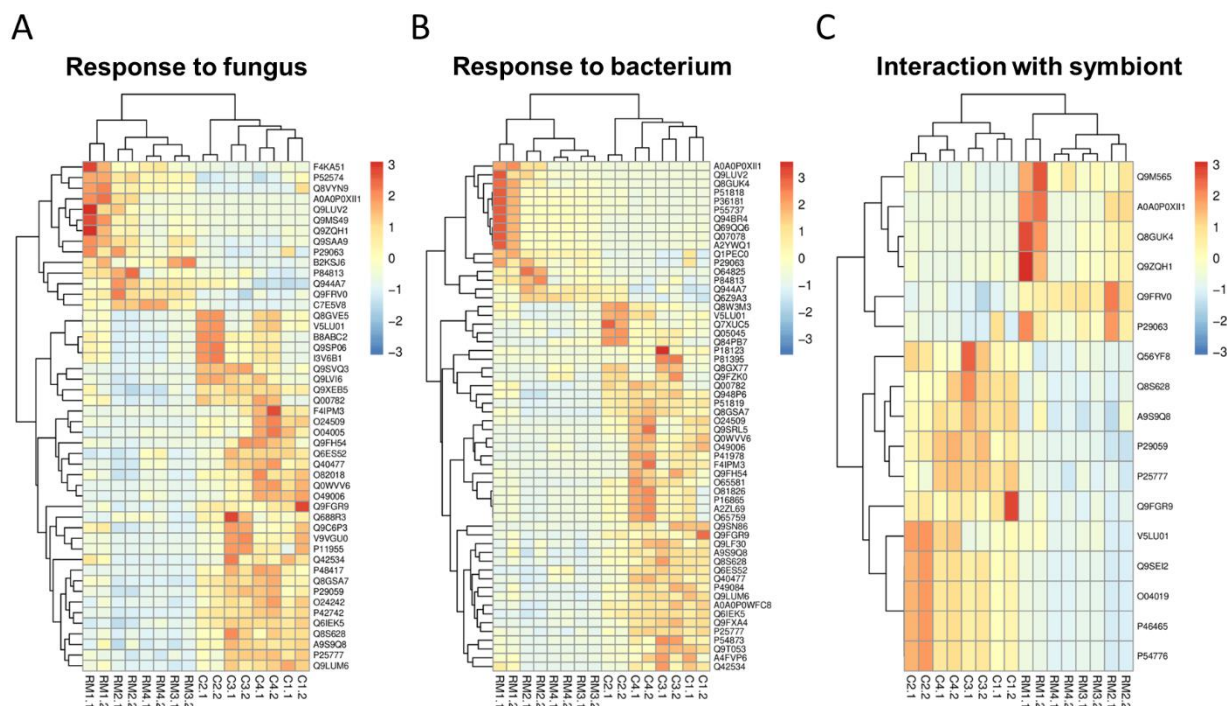


Figura 4 - Agrupamento hierárquico de proteínas diferencialmente abundantes relacionadas aos estímulos bióticos identificadas nas raízes de *M. acutistipula* amostradas de RM (RM1.1, RM1.2, RM2.1, RM2.2, RM3.1, RM3.2, RM4.1 e RM4.2) e de canga (C1.1, C1.2, C2.1, C2.2, C3.1, C3.2, C4.1 e C4.2). A) “Response to fungus”. B) “Response to bacterium”. C) “Interaction with symbiont”. As cores vermelha e azul representam os valores de maior e menor intensidade, respectivamente. Os números de acessos representam as proteínas utilizadas para as análises e podem ser visualizadas na Tabela Suplementar 1.

Nos “heatmaps” das figuras 3 e 4 pode ser observado, portanto, que as proteínas em destaque relacionadas às respostas ao déficit hídrico (Figura 3A), ao calor (Figura 3B), ao estresse salino (Figura 3C) e aos íons metálicos, bem como as atribuídas às respostas aos fungos (Figura 4A), as bactérias (Figura 4B) e simbiotes (Figura 4C), foram identificadas em plantas de ambos os ambientes, sendo mais abundantes em plantas de canga. Resposta aos íons metálicos (Figura 3D) representa o único grupo em que todas as proteínas em destaque foram mais abundantes em plantas de canga.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelas PCAs dos proteomas da *M. acutistipula* sugerem que a abundância diferencial de proteínas pode, de fato, está sendo induzida pelos ambientes onde as plantas cresceram. Amostras de canga foram mais agrupadas, enquanto os maiores distanciamentos entre as amostras de plantas de RM indicam maior heterogeneidade das plantas crescidas nessas áreas. Este mesmo padrão foi observado em estudo do proteoma de *D. apurensis* crescidas em canga e RM (Nascimento *et al.*, 2022). No entanto, ainda não se tem conhecimento sobre outros fatores como as diferenças nas variabilidades genótípicas dessas populações entre plantas de RM e de canga, que podem ser determinantes nos padrões observados.

Os maiores níveis de proteínas relacionadas aos estresses abióticos em plantas de canga estão relacionados aos fatores estressantes relatados nesse ambiente. Além da baixa disponibilidade de nutrientes, acidez do solo e alta concentração de metais, especialmente o ferro (Pinto *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019b), há também relatos de altas temperaturas e baixa capacidade de retenção de água no solo como fatores limitantes em ambientes de canga (Jacobi *et al.*, 2007; Vincent e Meguro, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Skirycz *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2015; Giannini *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). Após a extração do minério de ferro, as áreas de mineração são caracterizadas pela remoção da cobertura vegetal e camadas do solo (Gastauer *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2022). Os solos desses ambientes passam a apresentar baixo teor de nutrientes e matéria orgânica, além de estarem expostos ao ressecamento (Zaapi *et al.*, 2018). Por outro lado, antes da etapa de revegetação, os solos passam por processos de adequações física e química (Zappi *et al.*, 2018). Essas adequações podem tornar ambientes de RM menos desafiadores que canga, exigindo menos da maquinaria envolvida nas respostas das plantas aos estressores.

As proteínas identificadas neste estudo forneceram novas evidências a nível molecular sobre os mecanismos adaptativos de espécies nativas para sua adaptação em ecossistemas de canga. Destacam-se aqui as proteínas que foram significativamente abundantes, especialmente aquelas atribuídas ao déficit hídrico, ao calor, à resposta aos íons metálicos e às associações com microrganismos do solo. Essas proteínas estão entre as mais representativas principalmente em plantas de canga, indicando que este ambiente é o mais severo. Além de essas proteínas estarem envolvidas no bom desenvolvimento desta espécie em ambientes estressantes, os resultados também sugerem uma relação com os efeitos das mudanças no ecossistema de RM,

que interferem nas propriedades biológicas do sistema radicular e no crescimento médio das plantas. A longo prazo, esse conjunto de proteínas pode contribuir para o estabelecimento da *M. acutistipula* em RM, mesmo diante de eventos estressantes no ecossistema em desenvolvimento.

As proteínas de respostas aos estímulos bióticos apresentam funções relacionadas à atividade de biocontrole contra fitopatógenos e simbiose. Um estudo recente caracterizou o perfil proteico e as interações simbióticas que permitem o crescimento da *Dioclea apurensis* em canga e em áreas mineradas em reabilitação na Serra dos Carajás, mostrando que as proteínas envolvidas nas respostas aos estresses abióticos como déficit hídrico, privação de fósforo e excesso de metais pesados, além de proteínas envolvidas em associações simbióticas, estão no centro das respostas metabólicas evoluídas nesta espécie em ambientes de canga (Nascimento *et al.*, 2022). Neste mesmo estudo observaram que a *D. apurensis* estabelece interações não específicas com microrganismos do solo em canga e em RM. Em estudo recente Costa *et al.* (2021) mostraram que a *M. acutistipula* também estabelece interações não específicas com microrganismos do solo, incluindo táxons benéficos, como bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos e outros endófitos benéficos, tanto em canga quanto em RM. Essas características parecem conservadas em *M. acutistipula* e *D. apurensis*. Assim, os perfis proteicos sugerem que esses mecanismos são críticos e refletem na capacidade de crescimento e estabelecimento da *M. acutistipula* em canga e podem apoiar seu estabelecimento em áreas mineradas em reabilitação.

PROTEÍNAS RELACIONADAS AOS ESTÍMULOS ABIÓTICOS

Além de enzimas, nos proteomas foram identificados diversos fatores de transcrição. Entre elas, a “sensitive to proton rhizotoxicity 1” (também conhecida como STOP1), uma proteína dedo de zinco que desempenha papel crítico na tolerância das plantas diante de fatores estressantes em solos ácidos (Sadhukhan *et al.*, 2021). Outros fatores de transcrição identificados como a “dehydration-responsive element-binding protein 2” integra uma família de proteínas conhecidas por conferir tolerância aos estresses abióticos, como o estresse salino, déficit hídrico e calor (Tiwari *et al.*, 2012). Embora os maiores níveis de fatores de transcrição ocorram em plantas de canga, a presença dessas moléculas também em plantas de RM sugere a

importância para a adaptação da espécie nos dois ambientes em decorrência de possíveis estresses ambientais.

As proteínas envolvidas na sinalização de Ca^{2+} e do ácido abscísico (ABA) estão entre as mais representativas das atribuídas aos estresses abióticos, especialmente à alta salinidade, calor e déficit hídrico. Esses resultados ajudam a entender a importância da integração das vias de sinalização de Ca^{2+} e ABA para as adaptações de espécies como a *M. acutistipula* a ambientes estressantes. Essas proteínas também foram identificadas em plantas crescidas em ambos os ambientes, com maiores níveis em plantas de canga.

Para reconhecer e responder a diferentes mudanças ambientais, as plantas utilizam sensores que atuam no reconhecimento de estímulos, que permitem que as plantas respondam a múltiplas pressões externas simultaneamente, regulando genes e fatores de transcrição envolvidos na biossíntese de proteínas e metabólitos. Nas plantas, as proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs ou CPKs) são os principais sensores primários de Ca^{2+} que decodificam e transmitem informações complexas para a transdução de sinais e desencadeiam respostas aos estressores externos (Brandt *et al.*, 2015; Atif *et al.*, 2019; Delormel e Boudsocq, 2019). Entre as proteínas envolvidas na decodificação de sinal dependente de Ca^{2+} identificadas neste estudo também estão calmodulinas (CaMs), “CaM-like proteins”, “Calcineurin-like proteins” (CBLs) e “CBL-interacting protein kinases” (CIPKs) (Farkas *et al.*, 2007; Kim, 2013; Tang *et al.* 2020; Plasencia *et al.*, 2021).

As proteínas CPK5, CPK7, CPK26 e CPK33 estão entre as envolvidas na sinalização dependente de Ca^{2+} com maiores níveis em plantas de canga. Estudos que mostram as funcionalidades dessas proteínas sugerem que a CPK7 atua na mediação das redes de sinalização para regular a expressão gênica (incluindo a subfamília ABF de fatores de transcrição bZIP) durante o déficit hídrico e o estresse salino (Geng *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Delormel e Boudsocq, 2019). CPK5 é um regulador positivo do fechamento estomático induzido por ABA, regulando os fatores de transcrição e canais iônicos (Brandt *et al.*, 2015; Atif *et al.*, 2019). A CPK26 contribui para a tolerância ao estresse salino e provavelmente ao déficit hídrico (Dubrovina e Kiselev, 2019; Acharya *et al.*, 2022), estando envolvida no “crosstalk” entre a resposta do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a sinalização do ABA para a ativação de fatores de transcrição de genes responsivos a esses estresses. A CPK33 também está envolvida na regulação do fechamento estomático mediado por ABA (Li *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017).

“ABA receptor pyrabactin resistance” (PYL12), “ABC transporter G family member 51”, “abscisic acid 8'-hydroxylase 1” e “probable protein phosphatase 2C 43” (PP2C) foram mais abundantes em plantas de canga e estão envolvidas na principal via de sinalização do ABA (Hou *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2020). A “ABC transporter G family member 51”, é membro da família de transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC), associada ao transporte de ABA (Goodger e Schachtman, 2010; Jarzyniak e Jasiński, 2014). Já a “abscisic acid 8'-hydroxylase 1” está envolvida em uma das principais vias catabólicas para o controle do conteúdo de ABA (Liu *et al.*, 2014). Em plantas de RM, a “abscisic stress-ripening protein 5”, e “probable protein phosphatase 2C 77” foram mais abundantes.

As proteínas PP2Cs medeiam a via de sinalização do ABA por “feedback” negativo ao desfosforilar proteínas envolvidas na ativação de fatores de transcrição dos genes responsivos ao ABA (Hou *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2020). As PP2Cs também regulam negativamente por desfosforilação do SLAC1, um canal iônico vital nas células-guarda que regula o fechamento estomático (Vahisalu *et al.*, 2008; Brandt *et al.*, 2015). Portanto, as funcionalidades das proteínas envolvidas na sinalização e catabolismo do ABA são essenciais para a eficácia no processo de abertura e fechamento estomático necessário para regular o conteúdo de CO₂ e água nas células (Goodger e Schachtman, 2010; Brandt *et al.*, 2015), contribuindo para maior tolerância aos eventos de seca relatados principalmente em canga.

As plantas de canga também apresentaram níveis mais elevados de “dehydrin” RAB16C, que estão incluídas em um grupo de proteínas abundantes na embriogênese tardia, envolvidas no crescimento, desenvolvimento e resposta aos estresses em plantas, especialmente ao déficit hídrico (Sena *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2021). A rede reguladora da expressão do gene da “dehydrin” envolve as vias de transdução de sinais do ABA, incluindo PYLs, PP2Cs e BZIPs, bem como as CaMs, CDPKs, CBLs e CMLs, das vias de transdução de sinais dependente de Ca²⁺ (Sena *et al.*, 2018). Este resultado sugere a “dehydrin” como uma das proteínas críticas na adaptação de *M. acutistipula* a eventos de seca.

Os “ethylene response factors” (ERFs) também apresentaram níveis mais elevados nas plantas de canga (ERF4, ERF114 e RAP2-9). Este grupo de proteínas regula genes envolvidos em processos biológicos como crescimento, desenvolvimento e resposta aos estresses como o déficit hídrico, calor e estresse salino na presença do etileno (Chen *et al.*, 2021). Além disso, um subconjunto de ERFs reconhece o “dehydration-responsive element”, por uma sequência conservada em genes responsivos a esses estresses (Tiwari e Belachew, 2012; Chen *et al.*, 2021). Em acordo com esses estudos, uma “dehydration-responsive element-binding protein

2B” também foram atribuídas ao déficit hídrico, ao calor e ao estresse salino. O etileno também interage de forma antagônica com o ABA, onde um influencia na biossíntese e nas vias de sinalização do outro em resposta aos estresses abióticos. Um dos principais resultados dessa interação é o controle da divisão e diferenciação celular nas raízes. Nas folhas, essa interação é essencial na regulação do movimento estomático para o equilíbrio durante o estresse osmótico (Chen *et al.*, 2021).

Neste estudo também foram identificados a “auxin response factor 15” e a “auxin-responsive protein IAA27” com níveis mais elevados em plantas de canga. Essas proteínas participam das vias de sinalização das auxinas em respostas positivas aos estresses ambientais (Salehin *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

No presente estudo, resposta aos íons metálicos representa o único grupo em que todas as proteínas em destaque (considerando $p < 0.05$ e $FC \geq 2$) foram mais abundantes em plantas de canga. Entre elas estão a “heavy metal-associated isoprenylated plant protein 21” (HIPP) e a “ferritin 2” (FER), cloroplastidial. HIPPs e FER são umas das proteínas mais estudadas por suas funções na homeostase e detoxificação de metais pesados em plantas. HIPPs pertencem a um grupo de metalochaperonas de ligação a metais (Abreu-Neto *et al.*, 2013). Apesar das HIPPs estarem envolvidas na tolerância a estresses bióticos, como defesa a ataque de patógenos, e abióticos, como estresse salino e déficit hídrico (Rono *et al.*, 2022), os esforços para caracterizar suas funcionalidades estão concentrados principalmente em seu papel na homeostase e detoxificação de plantas estressadas pelo excesso de metais pesados. As HIPPs são encontradas apenas em plantas vasculares, atuando como proteínas-chave para o transporte seguro de íons metálicos dentro da célula, a fim de evitar reações deletérias com outros elementos celulares (Abreu-Neto *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2015; Rono *et al.*, 2022). Já a FER representa uma das principais proteínas envolvida na homeostase de ferro livre em plantas ao realizar o sequestro citoplasmático de alta quantidade de ferro solúvel (Stein *et al.*, 2009; Shevyakova *et al.*, 2011), transportando e acumulando o seu excesso nos vacúolos de forma segura e biodisponível.

Uma das principais causas da toxicidade por excesso de metais é o deslocamento de metais essenciais em biomoléculas-chave (Daghino *et al.*, 2016). Para sobreviver, as plantas precisam desenvolver estratégias a fim de impedir a absorção pelas raízes e reduzir o transporte de longa distância dos íons metálicos (Singh *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020). Os solos de cangas são zonas onde se espera que o ferro e resíduos de outros metais disponíveis nos substratos causem danos às plantas estabelecidas nestes locais (Zappi *et al.*, 2018; Guedes *et al.*, 2021;

Gastauer *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2022), sugerindo que essas sejam as principais causas dos maiores níveis dessas proteínas em plantas de canga.

PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM INTERAÇÕES COM MICRORGANISMOS

Diversas proteínas relacionadas às interações com microrganismos apresentaram níveis mais elevados nas plantas de canga. Por outro lado, essas proteínas também foram identificadas nas raízes de *M. acutistipula* de RM. Entre elas, proteínas críticas com papéis relatados na atividade de biocontrole contra espécies fitopatogênicas, incluindo “endochitinases” (Kasprzewska, 2003), “farnesene synthase” (Souleyre *et al.*, 2019), “pectinesterase inhibitor” (Sattayachiti *et al.*, 2020), “heat shock proteins” (Berka *et al.*, 2022) e “chitin elicitor receptor” (Gong *et al.*, 2020). Isso está diretamente relacionado à complexidade dos ambientes de canga nativa e à diversidade microbiana em áreas mineradas em reabilitação, que apresenta comunidade microbiana modificada (Costa *et al.*, 2021; Nascimento *et al.*, 2022).

Foram também identificadas proteínas com papéis no estabelecimento da simbiose. Este grupo de proteínas inclui “LysM receptor kinases” (Gough *et al.*, 2018), “chitin receptor kinases” (Miyata *et al.*, 2014), “heat shock proteins” (Askari-Khorasgani e Pessarakli, 2019) e “subtilisin-like protease” (Takeda *et al.*, 2009). A simbiose com táxons microbianos benéficos como os de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias fixadoras de nitrogênio é a mais estudada na fitorremediação microbiana em solos metalíferos (Al-Garni, 2006; Ma *et al.*, 2019) como os de cangas amazônicas, sendo descrita como essencial para melhorar o estabelecimento de plantas em áreas mineradas (Fernandes *et al.*, 2018; Moreira-Grez *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2021; Nascimento *et al.*, 2022). Portanto, a abundância de proteínas envolvidas na resposta à infecção por microrganismos juntamente com aquelas que reforçam a simbiose ativa pode estar envolvida na adaptação da *M. acutistipula* em canga e apoia o seu estabelecimento em RM.

CONCLUSÕES

Os perfis proteicos mostraram que *M. acutistipula* crescendo em canga nativa possui um conjunto de proteínas para lidar com estresses abióticos como déficit hídrico, calor e excesso de metais pesados. Proteínas envolvidas na atividade de biocontrole e simbiose sugerem que esses mecanismos também são críticos para adaptação da espécie em canga. Os mecanismos

moleculares que permitem que se adapte às severidades de seu ambiente nativo fazem da *M. acutistipula* forte candidata para suportar condições desafiadoras que podem ocorrer em áreas mineradas em reabilitação ao longo do tempo. Assim, este estudo mostrou a importância das adaptações metabólicas adquiridas no ecossistema de canga, que podem explicar o motivo da *M. acutistipula* ser uma das espécies nativas mais promissoras utilizadas em programas de reabilitação de áreas mineradas na Amazônia oriental. Estudos com experimentos controlados devem ser realizados para avaliar a presença de características moleculares específicas que possam futuramente ajudar a identificar espécies de plantas nativas de canga a serem utilizadas com sucesso na reabilitação de áreas mineradas.

5. REFERÊNCIAS

- Abreu-Neto, J.B.; Turchetto-Zolet, A.C.; de Oliveira, L.F.; Zanettini, M.H.; Margis-Pinheiro, M. 2013. Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): Characterization of a family of proteins exclusive to plants. *FEBS J.* 280, 1604–1616.
- Al-Garni, S. M. S. 2006. Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixer *Rhizobium* bacterium. *African Journal of Biotechnology*, 5(2), 133-142.
- Alam, I.; Lee, D-G.; Kim, K-H.; Park, C-H.; Sharmin, S-A.; Lee, H.; Oh, K-W.; Yun, B-W.; Lee, B-H. 2010. Proteome analysis of soybean roots under waterlogging stress at an early vegetative stage. *Journal of Biosciences*. v. 35, n. 1, p. 49-62.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A. F. 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*. 231, 1237-1249.
- Aleksza, D., Horváth, G.V., Sándor, G., Szabados, L. 2017. Proline accumulation is regulated by transcription factors associated with phosphate starvation. *Plant Physiology*. 175, 555-567.
- An, J.-P., Li, R., Qu, F.-J., You, C.-X., Wang, X.-F., Hao, Y.-J., 2016. Apple F-box protein MdMAX2 regulates plant photomorphogenesis and stress response. *Frontiers in plant science*. 7, 1685.
- Alexova, R. and Millar, A. H. 2013. Proteomics of phosphate use and deprivation in plants, *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.201200266.
- Amir, R. 2010. Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants. *Amino Acids*. doi: 10.1007/s00726-010-0482-x.
- Askari-Khorasgani, O.; Pessarakli, M. 2019. Breeding for Improved Plant–Symbiont Thermotolerance and Symbiotic Performance by Regulating Heat Shock Proteins, RNA Binding Proteins, and Chaperones. In *Handbook of Plant and Crop Stress*, Fourth Edition; CRC Press. pp. 603-633.
- Atif, R.M.; Shahid, L.; Waqas, M.; Ali, B.; Rashid, M.A.R.; Azeem, F.; Nawaz, M.A.; Wani, S.H.; Chung, G. 2019. Insights on calcium-dependent protein kinases (CPKs) signaling for abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*. 20, 5298.
- Baek, D., Kim, M. C., Kumar, D., Park, B., Cheong, M. S., Choi, W., Park, H. C., Chun, H. J., Park, H. J., Lee, S. Y. 2019. AtPR5K2, a PR5-Like Receptor Kinase, Modulates Plant

Responses to Drought Stress by Phosphorylating Protein Phosphatase 2Cs. *Frontiers in plant science*. 10, 1146.

Bai, L., Zhang, G., Zhou, Y., Zhang, Z., Wang, W., Du, Y., Wu, Z., Song, C.P., 2009. Plasma membrane associated proline rich extensin like receptor kinase 4, a novel regulator of Ca²⁺ signalling, is required for abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 60, 314-327.

Barneby, C.R. 1991. *Sensitivae Censitae*. A description of the genus *Mimosa* L. (Mimosaceae) in the New World. *Mem. New York Bot. Gard.* 65:1-835.

Berka, M.; Luklová, M.; Dufková, H.; Berková, V.; Novák, J.; Saiz-Fernández, I.; Rashotte, A.M.; Brzobohatý, B.; Černý, M. 2020. Barley root proteome and metabolome in response to cytokinin and abiotic stimuli. *Frontiers in plant Science*. 11, 1647.

Bielach, A., Hrtyan, M., Tognetti, V. B., 2017. Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *International journal of molecular sciences*. 18, 1427.

Brandt, B.; Munemasa, S.; Wang, C.; Nguyen, D.; Yong, T.; Yang, P.G.; Poretsky, E.; Belknap, T.F.; Waadt, R.; Alemán, F. 2015. Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* guard cells. *Elife*. 4, e03599.

Briat, J.-F., Lobréaux, S., 1997. Iron transport and storage in plants. *Trends in plant science*. 2, 187-193.

Boyer, S., Wratten, S. D. 2010. The potential of earthworms to restore ecosystem services after opencast mining - A review. *Basic Appl Ecol.* 11:196–203. doi:10.1016/j.baae.2009.12.005

Bozzo, G. G., Dunn, E. L. and Plaxton, W. C. 2006. Differential synthesis of phosphate starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/j.13653040.2005.01422.x.

Bu, Q., Lv, T., Shen, H., Luong, P., Wang, J., Wang, Z., Huang, Z., Xiao, L., Engineer, C., Kim, T.H. 2014. Regulation of drought tolerance by the F-box protein MAX2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 164, 424-439.

Cao, Y., Luo, Q., Tian, Y., Meng, F. 2017. Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *Amygdalus Mira* (Koehne) Yü et Lu roots. *BMC plant biology* 17, 53.

Carvalho, J. M., Ramos, S. J., Furtini, A. E., Gastauer, M., Cecílio, F. C., Siqueira, J. O., Silva, M. L. S. 2018. Influence of nutrient management on growth and nutrient use efficiency of two plant species for mineland revegetation. *Restoration Ecology*, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 303310.

- Carvalho, C. S, Forester, B. R, Mitre, S. K, et al. 2020. Combining genotype, phenotype, and environmental data to delineate site-adjusted provenance strategies for ecological restoration. *bioRxiv*. doi:10.1101/2019.12.11.872747
- Chakrabarty, D., Trivedi, P. K., Misra, P., Tiwari, M., Shri, M., Shukla, D., Kumar, S., Rai, A., Pandey, A., Nigam, D. 2009. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere*. 74, 688-702.
- Chen, D.-H.; Liu, H.-P.; Li, C.-L. 2019. Calcium-dependent protein kinase CPK9 negatively functions in stomatal abscisic acid signaling by regulating ion channel activity in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*. 99, 113-122.
- Chen, H.; Bullock Jr, D.A.; Alonso, J.M.; Stepanova, A.N. 2021. To fight or to grow: the balancing role of ethylene in plant abiotic stress responses. *Plants* 11, 33.
- Chen, H., Li, Z., Xiong, L., 2012. A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress. *Febs Letters* 586, 1742-1747.
- Cheng, Y.; Chen, G.; Hao, D.; Lu, H.; Shi, M.; Mao, Y.; Huang, X.; Zhang, Z.; Xue, L. 2014. Salt-induced root protein profile changes in seedling of maize inbred lines with differing salt tolerances. *Chilean Journal Of Agricultural Research*. v. 74, n. 4, p. 469-476.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Panda, S. K. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior*. 8, e23681.
- Chevalier, F. and Rossignol, M. 2011 Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with contrasted root architecture in response to phosphate deficiency, *Journal of Plant Physiology*. doi: 10.1016/j.jplph.2011.05.024.
- Costa, P.H.d.O.; Nascimento, S.V.d.; Herrera, H.; Gastauer, M.; Ramos, S.J.; Caldeira, C.F.; Oliveira, G.; Valadares, R.B.d.S. 2021. Non-Specific Interactions of Rhizospheric Microbial Communities Support the Establishment of *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* in an Amazon Rehabilitating Mineland. *Processes*, 9, 2079.
- Daghino, S., Martino, E., Perotto, S. 2016. Model systems to unravel the molecular mechanisms of heavy metal tolerance in the ericoid mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 26, 263-274.
- Das, K., Roychoudhury, A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. 2, 53.
- Daszkowska-Golec, A. 2016. The role of abscisic acid in drought stress: how ABA helps plants to cope with drought stress. *Drought Stress Tolerance in Plants*. pp. 123-151.

- Delormel, T.; Boudsocq, M. 2019. Properties and functions of calcium-dependent protein kinases and their relatives in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 224, 585-604.
- dos Santos, R. S. P., Milanez, B. 2015. The Global Production Network for iron ore: materiality, corporate strategies, and social contestation in Brazil. *The Extractive Industries and Society* 2, 756-765.
- Emenecker, R.J.; Strader, L.C. 2020. Auxin-abscisic acid interactions in plant growth and development. *Biomolecules*. 10, 281.
- Erbasol, I., Bozdag, G.O., Koc, A., Pedas, P., Karakaya, H. C. 2013. Characterization of two genes encoding metal tolerance proteins from *Beta vulgaris* subspecies *maritima* that confers manganese tolerance in yeast. *Biomaterials*. 26, 795-804.
- Ernst, L.; Goodger, J.Q.; Alvarez, S.; Marsh, E.L.; Berla, B.; Lockhart, E.; Jung, J.; Li, P.; Bohnert, H.J.; Schachtman, D.P. 2010. Sulphate as a xylem-borne chemical signal precedes the expression of ABA biosynthetic genes in maize roots. *Journal of Experimental Botany*. 61, 3395-3405.
- Fan, W., Wang, H., Zhang, P. 2016. Engineering Glycinebetaine Metabolism for Enhanced Drought Stress Tolerance in Plants. *Drought Stress Tolerance in Plants*. pp. 513-530.
- Farkas, I.; Dombradi, V.; Miskei, M.; Szabados, L.; Koncz, C. 2007. *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends in plant Science*. 12, 169-176.
- Feng, Y.; Wang, J.; Bai, Z.; Reading, L. 2019. Effects of surface coal mining and land reclamation on soil properties: A review. *Earth-Science Reviews*. 191, 12-25.
- Fernandes, C.C.; Kishi, L.T.; Lopes, E.M.; Omori, W.P.; Souza, J.A.M.d.; Alves, L.M.C.; Lemos, E.G.d.M. 2018. Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. *brazilian journal of microbiology*. 49, 489-502.
- Fukuda, T., Saito, A., Wasaki, J., Shinano, T., Osaki, M. 2007. Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. *Plant Science*. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.02.020.
- Fujioka, H., Samejima, H., Suzuki, H., Mizutani, M., Okamoto, M., Sugimoto, Y. 2019. Aberrant protein phosphatase 2C leads to abscisic acid insensitivity and high transpiration in parasitic *Striga*. *Nature plants*. 5, 258-262.
- Faria, S. M. et al. Composição florística de leguminosas com potencial para fixação biológica de nitrogênio em áreas de vegetação de canga (savana metalófito) do entorno do complexo minerador de Carajás. Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2011.

- Fowler, W.M.; Fontaine, J.B.; Enright, N.J.; Veber, W.P. 2015. Evaluating restoration potential of transferred topsoil. *Applied Vegetation Science*, 18, 379-390.
- Garris, H. W., Baldwin, S. A., Van Hamme, J. D., Gardner, W. C., Fraser, L. H. 2016. Genomics to assist mine reclamation: A review. *Restor Ecol.* 24:165–173. doi:10.1111/rec.12322
- Gastauer, M., S.R. Silva, C.F. Caldeira, S.J. Ramos, P.F.M. Souza Filho, A.E. Furtini Neto, and J.O. Siqueira. 2018. Mine land rehabilitation: Modern ecological approaches for more sustainable mining. *Journal of Cleaner Production*, 172, pp. 1409-1422.
- Gastauer, M., Souza Filho, P. W. M., Ramos, S.J., Caldeira, C.F., Silva, J. R., Siqueira, J.O., Furtini Neto, A. E. 2019. Mine land rehabilitation in Brazil: Goals and techniques in the context of legal requirements. *Ambio*. 48:74–88.
- Gastauer, M.; de Medeiros Sarmento, P.S.; Santos, V.C.A.; Caldeira, C.F.; Ramos, S.J.; Teodoro, G.S.; Siqueira, J.O. 2020. Vegetative functional traits guide plant species selection for initial mineland rehabilitation. *Ecological Engineering*, 148, 105763.
- Gastauer, M.; Ramos, S.J.; Caldeira, C.F.; Siqueira, J.O. 2021. Reintroduction of native plants indicates the return of ecosystem services after iron mining at the Urucum Massif. *Ecosphere*. 12, e03762.
- Gastauer, M., Nascimento, W. R., Caldeira, C. F., Ramos, S. J., Souza-Filho, P. W. M., Féret, J. B. 2022. Spectral diversity allows remote detection of the rehabilitation status in an Amazonian iron mining complex. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*.
- Geng, S.; Zhao, Y.; Tang, L.; Zhang, R.; Sun, M.; Guo, H.; Kong, X.; Li, A.; Mao, L. 2011. Molecular evolution of two duplicated CDPK genes CPK7 and CPK12 in grass species: a case study in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Gene*. 475, 94-103.
- Gho, Y.-S., An, G., Park, H.-M., Jung, K.-H. 2018. A systemic view of phosphate starvation responsive genes in rice roots to enhance phosphate use efficiency in rice. *Plant Biotechnology Reports*. 12, 249-264.
- Giannini, T. C, Giulietti, A. M., Harley, R. M., Viana, P. L., Jaffe, R., Alves, R., Pinto, C. E., Mota, N. F. O., Caldeira, Jr. C. F., Imperatriz-Fonseca, V. L. Furtini, A. E., Siqueira, J. O. 2017. Selecting plant species for practical restoration of degraded lands using a multiple-trait approach. *Austral Ecol.* 42:510–521. doi:10.1111/aec.12470

Ginocchio, R., Baker, A. J. 2004. Metallophytes in Latin America: a remarkable biological and genetic resource scarcely known and studied in the region. *Revista Chilena de Historia Natural* 77, 185-194.

Giri J. 2011. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav.* doi:10.4161/psb.6.11.17801

Gong, B.-Q.; Wang, F.-Z.; Li, J.-F. 2020. Hide-and-seek: chitin-triggered plant immunity and fungal counterstrategies. *Trends in plant Science*. 25, 805-816.

Goodger, J. Q., Schachtman, D. P. 2010. Re-examining the role of ABA as the primary longdistance signal produced by water-stressed roots. *Plant signaling & behavior*. 5, 1298-1301.

Guedes, R.S., Ramos, S.J., Gastauer, M. et al. 2021. Challenges and potential approaches for soil recovery in iron open pit mines and waste piles. *Environ Earth Sci* 80, 640.

Hasan, M., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X.-Y., Ahammed, G. J., Qi, Z.-Y. 2017. Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. *Frontiers in plant science*. 8, 1492.

Hashemi, F.S.; Ismail, M.R.; Rafii, M.Y.; Aslani, F.; Miah, G.; Muharam, F.M. 2018. Critical multifunctional role of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32, 815-829.

Herrera, H., Valadares, R., Oliveira, G., Fuentes, A., Almonacid, L., do Nascimento, S. V., Bashan, Y., Arriagada, C. 2018. Adaptation and tolerance mechanisms developed by mycorrhizal *Bipinnula fimbriata* plantlets (Orchidaceae) in a heavy metal-polluted ecosystem. *Mycorrhiza*. 28, 651-663.

Hou, Y.-J.; Zhu, Y.; Wang, P.; Zhao, Y.; Xie, S.; Batelli, G.; Wang, B.; Duan, C.-G.; Wang, X.; Xing, L. 2016. Type one protein phosphatase 1 and its regulatory protein inhibitor 2 negatively regulate ABA signaling. *PLoS Genetics*. 12, e1005835.

Hristozkova, M., Geneva, M., Stancheva, I., Iliev, I., Azcón-Aguilar, C., 2017. Symbiotic association between golden berry (*Physalis peruviana*) and arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal-contaminated soil. *Journal of Plant Protection Research*. 57, 173-184.

Husain, R.; Weeden, H.; Bogush, D.; Deguchi, M.; Soliman, M.; Potlakayala, S.; Katam, R.; Goldman, S.; Rudrabhatla, S. 2019. Enhanced tolerance of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) plants on abandoned mine land soil leads to overexpression of cannabinoids. *PLoS One* .14, e0221570.

- Jacobi, C. M., Do Carmo, F. F., Vincent, R. C., Stehmann, J. R. 2007. Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodiversity and Conservation*. 16, 2185-2200.
- Jalmi, S. K., Bhagat, P. K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K., Sharma, D., Sinha, A. K. 2018. Traversing the links between heavy metal stress and plant signaling. *Frontiers in plant science*. 9, 12.
- Jalmi, S. K., Sinha, A. K. 2015. ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stressstriking similarities and differences. *Frontiers in plant science*. 6, 769.
- Jarzyniak, K. M., Jasiński, M. 2014. Membrane transporters and drought resistance—a complex issue. *Frontiers in plant science*. 5, 687.
- Jiang, C., Bi, Y., Zhang, R., Feng, S. 2020. Expression of RcHSP70, heat shock protein 70 gene from Chinese rose, enhances host resistance to abiotic stresses. *Scientific Reports*. 10, 1-10.
- Jianjun, S., Chunjian, H., Ping, L., Junwei, Z., Deyuan, L., Minde, J., Lin, Z., Jingkai, Z., Jianying, S. 2012. Quantitative prediction of mining subsidence and its impact on the environment. *International Journal of Mining Science and Technology*. 22, 69-73.
- Jung, C.; Nguyen, N.H.; Cheong, J.-J. 2020. Transcriptional Regulation of Protein Phosphatase 2C Genes to Modulate Absciscic Acid Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 9517.
- Kalubi, K.; Michael, P.; Omri, A. 2018. Analysis of gene expression in red maple (*Acer rubrum*) and trembling aspen (*Populus tremuloides*) populations from a mining region. *Genes & genomics*. 40, 1127-1136.
- Kasprzewska, A. 2003. Plant chitinases-regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 8, 809-824.
- Kettler, T. A., Doran, J. W. and Gilbert, T. L. 2001. Simplified Method for Soil Particle-Size Determination to Accompany Soil-Quality Analyses. *Soil Science Society of America Journal*. doi: 10.2136/sssaj2001.653849x.
- Kim, K.-N. 2013. Stress responses mediated by the CBL calcium sensors in plants. *Plant biotechnology reports*. 7, 1-8.
- Kim, S.; Wang, Y.; Lee, C.; Mun, B.; Kim, P.; Lee, S. and others. 2011. A Comparative Proteomics Survey of Proteins Responsive to Phosphorous Starvation in Roots of Hydroponically-Grown Rice Seedlings. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. doi.org/10.3839/jksabc.2011.102

- Kirk, P.L. 1950. Kjeldahl method for total nitrogen. *Analytical chemistry*, 22, 354-358.
- Kishor, K., Polavarapu, B., Hima Kumari, P., Sunita, M., Sreenivasulu, N. 2015. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Frontiers in plant science*. 6, 544.
- Komatsu, S.; Hossain, Z. 2013. Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. *Frontiers In Plant Science*, v. 4, n. 71.
- Lehmann, J.; da Silva Cravo, M.; de Macêdo, J.L.V.; Moreira, A.; Schroth, G. 2001. Phosphorus management for perennial crops in central Amazonian upland soils. *Plant and Soil*, 237, 309-319.
- Lewis, G. P. 2005. *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens Kew. 577 pages.
- Liang, C. Tian, J.; Lam, H.; Lim, B.; Yan, X.; Liao, H. 2010. Biochemical and molecular characterization of PvPAP3, a novel purple acid phosphatase isolated from common bean enhancing extracellular ATP utilization. *Plant Physiology*. doi: 10.1104/pp.109.147918.
- Li, J., Zhang, M., Sun, J., Mao, X., Wang, J., Liu, H., Zheng, H., Li, X., Zhao, H. and Zou, D. 2020. Heavy Metal Stress-Associated Proteins in Rice and Arabidopsis: Genome-Wide Identification, Phylogenetics, Duplication, and Expression Profiles Analysis. *Front. Genet.* 11:477. doi: 10.3389/fgene.2020.00477
- Lin, D. L., Yao, H. Y., Jia, L. H., et al. 2020. Phospholipase D-derived phosphatidic acid promotes root hair development under phosphorus deficiency by suppressing vacuolar degradation of PIN-FORMED2. *New Phytol.* doi:10.1111/nph.16330
- Li, C.-L.; Wang, M.; Wu, X.-M.; Chen, D.-H.; Lv, H.-J.; Shen, J.-L.; Qiao, Z.; Zhang, W. 2016. THI1, a thiamine thiazole synthase, interacts with Ca²⁺-dependent protein kinase CPK33 and modulates the S-type anion channels and stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 170, 1090-1104.
- Li, R., Wang, J., Li, S., Zhang, L., Qi, C., Weeda, S., Zhao, B., Ren, S., Guo, Y.-D. 2016. Plasma membrane intrinsic proteins SlPIP2; 1, SlPIP2; 7 and SlPIP2; 5 conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. *Scientific reports*. 6, 31814.
- Li, D., Zhu, H., Liu, K., Liu, X., Leggewie, G., Udvardi, M., Wang, D. 2002. Purple acid phosphatases of Arabidopsis thaliana. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M204183200.

- Li, G.; Boudsocq, M.; Hem, S.; Vialaret, J.; Rossignol, M.; Maurel, C.; Santoni, V. 2015. The calcium-dependent protein kinase CPK 7 acts on root hydraulic conductivity. *Plant, cell & environment*. 38, 1312-1320.
- Li, K., Xu, C., Li, Z., Zhang, K., Yang, A., and Zhang, J. 2008. Comparative Proteome Analyses of Phosphorus Responses in Maize (*Zea Mays* L.) Roots of Wild-Type and a LowP-Tolerant Mutant Reveal Root Characteristics Associated with Phosphorus Efficiency. *Plant Journal*. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03561.x
- Liu, S.; Lv, Y.; Wan, X.-R.; Li, L.-M.; Hu, B.; Li, L. 2014. Cloning and expression analysis of cDNAs encoding ABA 8'-hydroxylase in peanut plants in response to osmotic stress. *PLoS One*. 9, e97025.
- López-Millán, A.-F., Grusak, M. A., Abadía, A., Abadía, J. 2013. Iron deficiency in plants: an insight from proteomic approaches. *Frontiers in plant science*. 4, 254.
- Lung, S., Leung, A., Kuang, R., Wang, Y., Leung, P., Lim, B. 2008. Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry*. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.06.036.
- Luo, S., Yin, J., Peng, Y., Xie, J., Wu, H., He, D., Li, X., Cheng, G. 2020. Glutathione is Involved in Detoxification of Peroxide and Root Nodule Symbiosis of *Mesorhizobium huakuii*. *Current Microbiology*. 77, 1-10.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Oliveira, R. S., Zhang, C., & Freitas, H. 2019. Potential of plant beneficial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of metal-contaminated saline soils. *Journal of hazardous materials*, 379, 120813.
- Ma, Z.; Bielenberg, D.; Brown, K.; and Lynch, P. 2001. Regulation of Root Hair Density by Phosphorus Availability in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant, Cell and Environment*. doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00695.x
- Ma, C., Liu, H., Guo, H., Musante, C., Coskun, S. H., Nelson, B. C., White, J. C., Xing, B., Dhankher, O. P. 2016. Defense mechanisms and nutrient displacement in *Arabidopsis thaliana* upon exposure to CeO₂ and In₂O₃ nanoparticles. *Environmental Science*. 1369-1379.
- Macdonald, S. E., Landhäusser, S. M., Skousen, J., Franklin, J., Frouz, J., Hall, S., Jacobs, D. F., Quideau, S. 2015. Forest restoration following surface mining disturbance: challenges and solutions. *New Forests*. 46, 703-732.

- Mao, X.; Cai, T.; Olyarchuk, J.G.; Wei, L. 2005. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. *Bioinformatics*, 21, 3787-3793.
- Marques, M.; Aguiar, C.R.C.; Silva, J.J.L.S.d. 2011. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. *Revista Brasileira de Ciência do solo*. 35, 1-11
- Mattarozzi, M., Di Zinno, J., Montanini, B., Manfredi, M., Marengo, E., Fornasier, F., Ferrarini, A., Careri, M., Visioli, G. 2020. Biostimulants applied to maize seeds modulate the enzymatic activity and metaproteome of the rhizosphere. *Applied Soil Ecology*. 148, 103480.
- Mattos, C., Silva, W., Carvalho, C., Lima, A., Faria, S., Lima, H. 2018. Flora das cangas da serra dos Carajás, Pará, Brasil: Leguminosae. *Rodriguésia*. 69, 1147-1220.
- Maxwell, R. H. 2011. New species and notes in the genus *Dioclea* sl (Fabaceae, subtribe Diocleinae). *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*. 21, 226-243.
- Migocka, M., Papierniak, A., Kosieradzka, A., Posyniak, E., Maciaszczyk Dziubinska, E., Biskup, R., Garbiec, A., Marchewka, T. 2015. Cucumber metal tolerance protein Cs MTP 9 is a plasma membrane H⁺ coupled antiporter involved in the Mn²⁺ and Cd²⁺ efflux from root cells. *The Plant Journal*. 84, 1045-1058.
- Mishra, J., Singh, R., Arora, N.K. 2017. Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in microbiology*. 8, 1706.
- Mittler, R. 2017. ROS are good. *Trends in plant science*. 22, 11-19.
- Miller, S.; Liu, J.; Allan, D. L.; Menzhuber, C. J.; Fedorova, M.; Vance, C. P. 2001. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. *Plant Physiology*. doi: 10.1104/pp.010097.
- Miyata, K.; Kozaki, T.; Kouzai, Y.; Ozawa, K.; Ishii, K.; Asamizu, E.; Okabe, Y.; Umehara, Y.; Miyamoto, A.; Kobae, Y. 2014. The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant and Cell Physiology*. 55, 1864-1872.
- Moreira-Grez, B.; Muñoz-Rojas, M.; Kariman, K.; Storer, P.; O'Donnell, A.G.; Kumaresan, D.; Whiteley, A.S. 2019. Reconditioning degraded mine site soils with exogenous soil microbes: plant fitness and soil microbiome outcomes. *Frontiers in microbiology*. 1617.

- Muneer, S. and Jeong, B. R. 2015. Proteomic analysis provides new insights in phosphorus homeostasis subjected to pi (inorganic phosphate) starvation in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). PLoS ONE. doi: 10.1371/journal.pone.0134103.
- Nanjo, Y.; Skultety, L.; Uváčková, L.; Klubíková, K.; Hajduch, M.; Komatsu, S. 2012. Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedling. *Journal of Proteome Research*. 11:372-385.
- Nascimento, S.V.; Oliveira Costa, P.H.; Herrera, H.; Caldeira, C.F.; Gastauer, M.; Ramos, S.J.; Oliveira, G.; Valadares, R. 2022. Proteomic Profiling and Rhizosphere-Associated Microbial Communities Reveal Adaptive Mechanisms of *Dioclea Apurensis* Kunth in Eastern Amazon's Rehabilitating Minelands.
- Nascimento, S.V.; Magalhaes, M.M.; Cunha, R.L.; de Oliveira Costa, P.H.; de Oliveira Alves, R.C.; de Oliveira, G.C.; da Silva Valadares, R.B. 2018. Differential accumulation of proteins in oil palms affected by fatal yellowing disease. *PloS one*.13.
- Noshi, M., Yamada, H., Hatanaka, R., Tanabe, N., Tamoi, M., Shigeoka, S. 2017. Arabidopsis dehydroascorbate reductase 1 and 2 modulate redox states of ascorbate-glutathione cycle in the cytosol in response to photooxidative stress. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 81, 523-533.
- Nunes, J. 2009. Florística, Estrutura e Relações Solo-Vegetação em Gradiente Fitofisionômico Sobre Canga, na Serra sul, Flona de Carajás. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 101.
- Nunes, J. A., Schaefer, C. E., Ferreira Júnior, W. G., Neri, A. V., Correa, G. R., Enright, N. J. 2015. Soil-vegetation relationships on a banded ironstone 'island', Carajás Plateau, Brazilian Eastern Amazonia. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 87, 2097-2110.
- Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V., TorTI, F.M. 2001. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochemical Journal*. 357, 241-247.
- Oliveira, A.; Azarias Guimarães, A.; da Costa, A.M.; Louzada Rodrigues, T.; de Soares Carvalho, T.; Reis Sales, F.; de Souza Moreira, F.M. 2020. Plant growth-promoting rhizobacterial communities from an area under the influence of iron mining and from the adjacent phytophysionomies which have high genetic diversity. *Land Degradation & Development*, 31, 2237-2254.
- Oliveira, S. H. F., Negreiros, D., Fernandes, G. W., Brabosa, N. P. U., Rocha, R., and Almeida-Cortez, J. C. 2009. Seedling growth of the invader *Calotropis procera* in ironstone rupestrian

field and seasonally dry forest soils. *Neotrop. Biol. Conserv.* 4, 69–76. doi: 10.4013/nbc.2009.42.01

Osakabe, Y., Yamaguchi Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L. 2014. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytologist*. 202, 35-49.

Paudel, I., Gerbi, H., Zisovich, A., Sapir, G., Ben-Dor, S., Brumfeld, V., Klein, T. 2019. Drought tolerance mechanisms and aquaporin expression of wild vs. cultivated pear tree species in the field. *Environmental and Experimental Botany*. 167, 103832.

Plasencia, F.A.; Estrada, Y.; Flores, F.B.; Ortíz-Atienza, A.; Lozano, R.; Egea, I. 2021. The Ca²⁺ Sensor Calcineurin B-Like Protein 10 in Plants: Emerging New Crucial Roles for Plant Abiotic Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 2155.

Preite V, Sailer C, Syllwasschy L, Bray S, Ahmadi H, Krämer U, Yant L. 2019. Convergent evolution in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis arenosa* on calamine metalliferous soils. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 374. doi: 10.1098/rstb.2018.0243

Queiroz, Luciano Paganucci de. 2009. Leguminosas da caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana.

Queiroz, L., Cardoso, D., Conceição, A. d. S., de Souza, E., Tozzi, A., Pérez, A., da Silva, M., Simon, M., Mansano, V. D. F., Costa, J. 2009. Leguminosae. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Capítulo em livro científico (ALICE).

Ramos, S. J., Gastauer, M., Mitre, S. K., Caldeira, C. F., Silva, J. R., Neto, A. E., Oliveira, G., Souza Filho, P. W., Siqueira, J. O., 2019a. Plant growth and nutrient use efficiency of two native Fabaceae species for mineland revegetation in the eastern Amazon. *Journal of Forestry Research*, 1-7.

Ramos, S. J., Caldeira, C. F., Gastauer, M., et al., 2019b. Native leguminous plants for mineland revegetation in the eastern Amazon: seed characteristics and germination. *New For.* doi: 10.1007/s11056-019-09704-1

Ramos, S.J., Gastauer, M., Martins, G.C. et al. 2022. Changes in soil properties during iron mining and in rehabilitating minelands in the Eastern Amazon. *Environ Monit Assess* 194, 256.

Reczek, C. R., Chandel, N. S. 2015. ROS-dependent signal transduction. *Current opinion in cell biology*. 33, 8-13.

Ribeiro, P.G.; Martins, G.C.; Gastauer, M.; da Silva Junior, E.C.; Santos, D.C.; Frois Caldeira Júnior, C.; Cavalcante, R.B.L.; dos Santos, D.S.; Carneiro, M.A.C.; Valadares, R.B.d.S. 2022.

Spectral and soil quality index for monitoring environmental rehabilitation and soil carbon stock in an Amazonian sandstone mine. *Sustainability*. 14, 597.

Rono, J., Sun, D. Yang, Z. 2022. Metallochaperones: A critical regulator of metal homeostasis and beyond. *Gene*. 146352, 822.

Sadhukhan, A.; Kobayashi, Y.; Iuchi, S.; Koyama, H. 2021. Synergistic and antagonistic pleiotropy of STOP1 in stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 26, 1014-1022.

Sakamoto, K., Ogiwara, N., Kaji, T., Sugimoto, Y., Ueno, M., Sonoda, M., Matsui, A., Ishida, J., Tanaka, M., Totoki, Y. 2019. Transcriptome analysis of soybean (*Glycine max*) root genes differentially expressed in rhizobial, arbuscular mycorrhizal, and dual symbiosis. *Journal of plant research*. 132, 541-568.

Salehin, M.; Li, B.; Tang, M.; Katz, E.; Song, L.; Ecker, J.R.; Kliebenstein, D.J.; Estelle, M. 2019. Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in *Arabidopsis* by regulating glucosinolate levels. *Nature Communications*. 10, 1-9.

Satish, L., Rency, A. S., Ramesh, M. 2018. Spermidine sprays alleviate the water deficit-induced oxidative stress in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.) plants. *3 Biotech*.

Sattayachiti, W.; Wanchana, S.; Arikitt, S.; Nubankoh, P.; Patarapuwadol, S.; Vanavichit, A.; Darwell, C.T.; Toojinda, T. 2020. Genome-wide association analysis identifies resistance loci for bacterial leaf streak resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plants*. 9, 1673.

Schaefer, C. E.; Candido, H. G.; Correa, G. R.; Pereira, A.; Nunes, J. A.; Souza, O. F.; Marins, A.; Filho, E. F.; Ker, J. C. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. *Geossistemas Ferruginosos do Brasil*. 3i editora, p. 77-102, 2015.

Sena, J.; Giguère, I.; Rigault, P.; Bousquet, J.; Mackay, J. 2018. Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression. *Tree Physiology*. 38, 442-456.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*. 9 (8): 681.

Shehzadi, A., Akram, N. A., Ali, A., Ashraf, M. 2019. Exogenously applied glycinebetaine induced alteration in some key physio-biochemical attributes and plant anatomical features in water stressed oat (*Avena sativa* L.) plants. *Journal of Arid Land*. 11, 292-305.

- Shekoofa, A., Sinclair, T. R. 2018. Aquaporin activity to improve crop drought tolerance. *Cells*. 7, 123.
- Shevyakova, N., Eshinimaeva, B. T., Kuznetsov, V. V. 2011. Expression of ferritin gene in *Mesembryanthemum crystallinum* plants under different supply with iron and different intensity of oxidative stress. *Russian journal of plant physiology*. 58, 768.
- Shi, J., Fu, X.-Z., Peng, T., Huang, X.-S., Fan, Q.-J., Liu, J.-H. 2010. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiology*. 30, 914-922.
- Silva, J. R, Gastauer, M., Ramos, S. J., et al. Initial growth of Fabaceae species: Combined effects of topsoil and fertilizer application for mineland revegetation. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants*. 2018. doi: 10.1016/j.flora.2018.08.001
- Singh, A., Jha, S. K., Bagri, J., Pandey, G. K. 2015. ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *PloS one*.
- Singh, S.; Parihar, P.; Singh, R.; Singh, V.P.; Prasad, S.M. 2015. Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Front. Plant Sci*. 6, 1143.
- Skirycz, A., Castilho, A., Chaparro, C., Carvalho, N., Tzotzos, G., Siqueira, J.O. 2014. Canga biodiversity, a matter of mining. *Frontiers in plant science*. 5, 653.
- Skousen, J., Zipper, C.E. 2014. Post-mining policies and practices in the Eastern USA coal region. *International Journal of Coal Science & Technology*. 1, 135-151.
- Sobariu, D. L., Fertu, D. I. T., Diaconu, M., Pavel, L. V., Hlihor, R.-M., Drăgoi, E. N., Curteanu, S., Lenz, Corvini, P. F.-X., Gavrilescu, M. 2017. Rhizobacteria and plant symbiosis in heavy metal uptake and its implications for soil bioremediation. *New biotechnology*. 39, 125-134.
- Soto, J., Ortiz, J., Herrera, H., Fuentes, A., Almonacid, L., Charles, T. C., Arriagada, C. 2019. Enhanced Arsenic Tolerance in *Triticum aestivum* Inoculated with Arsenic-Resistant and Plant Growth Promoter Microorganisms from a Heavy Metal-Polluted Soil. *Microorganisms*. 7, 348.
- Souleyre, E.J.; Bowen, J.K.; Matich, A.J.; Tomes, S.; Chen, X.; Hunt, M.B.; Wang, M.Y.; Ileperuma, N.R.; Richards, K.; Rowan, D.D. 2019. Genetic control of α -farnesene production in apple fruit and its role in fungal pathogenesis. *The Plant Journal*. 100, 1148-1162.
- Sprent, J. I. 2009. Legume nodulation. A global perspective. Wiley-Blackwell, Chichester, U.K. 200p.

- Stein, R. J., Ricachenevsky, F. K., Fett, J. P. 2009. Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2). *Plant Science*. 177, 563-569.
- Sun, Z.; Li, S.; Chen, W.; Zhang, J.; Zhang, L.; Sun, W.; Wang, Z. 2021. Plant Dehydrins: Expression, Regulatory Networks, and Protective Roles in Plants Challenged by Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 22, 12619.
- Svistoonoff, S., Sy, M.-O., Diagne, N., Barker, D. G., Bogusz, D., Franche, C. 2010. Infection-specific activation of the *Medicago truncatula* Enod11 early nodulin gene promoter during actinorhizal root nodulation. *Molecular plant-microbe interactions*. 23, 740-747.
- Tang, R.-J.; Wang, C.; Li, K.; Luan, S. 2020. The CBL–CIPK calcium signaling network: Unified paradigm from 20 years of discoveries. *Trends in Plant Science* 25, 604-617.
- Tjellström, H. Andersson, M.; Larsson, K.; Sandelius, A. 2008. Membrane phospholipids as a phosphate reserve: The dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/j.13653040.2008.01851.x.
- Takeda, N.; Sato, S.; Asamizu, E.; Tabata, S.; Parniske, M. 2009. Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*. 58, 766-777.
- Tran, H. T., Hurley, B. A. and Plaxton, W. C. 2010a. Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition, *Plant Science*. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.04.005.
- Tran, H.; Qian, W.; Hurley, B.; She, Y.; Wang, D.; Plaxton, W. 2010b. Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: The predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02184.x.
- Trindade, F.C.; Ramos, S.J.; Gastauer, M.; Saraiva, A.M.M.; Caldeira, C.F.; Oliveira, G.; da Silva Valadares, R.B. 2020. Metaproteomes reveal increased capacity for stress tolerance of soil microbes in ferruginous tropical rocky outcrops. *Pedobiologia*, 81, 150664.
- Tyburski, J., Dunajska, K. and Tretyn, A. 2009. Reactive oxygen species localization in roots of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown under phosphate deficiency. *Plant Growth Regulation*. doi: 10.1007/s10725-009-9385-9.
- Tiwari, S.B.; Belachew, A.; Ma, S.F.; Young, M.; Ade, J.; Shen, Y.; Marion, C.M.; Holtan, H.E.; Bailey, A.; Stone, J.K. 2012. The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors. *The Plant Journal*. 70, 855-865.

- Tiwari, S., Lata, C. 2018. Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: an overview. *Frontiers in plant science*. 9, 452.
- Vadassery, J., Tripathi, S., Prasad, R., Varma, A., Oelmüller, R. 2009. Monodehydroascorbate reductase 2 and dehydroascorbate reductase 5 are crucial for a mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis*. *Journal of plant physiology*. 166, 1263-1274.
- Vahisalu, T.; Kollist, H.; Wang, Y.-F.; Nishimura, N.; Chan, W.-Y.; Valerio, G.; Lamminmäki, A.; Brosché, M.; Moldau, H.; Desikan, R. 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*. 452, 487-491.
- Vance, C. P., Uhde-Stone, C. and Allan, D. L. 2003. Phosphorus Acquisition and Use: Critical Adaptations by Plants for Securing a Nonrenewable Resource, *New Phytologist*. doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x
- Vanderschuren, H.; Lentz, E.; Zainuddin, I.; Gruissem, W. 2013. Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *Journal Of Proteomics*. v. 93, p. 5-19.
- Vatansever, R., Filiz, E., Eroglu, S. 2017. Genome-wide exploration of metal tolerance protein (MTP) genes in common wheat (*Triticum aestivum*): insights into metal homeostasis and biofortification. *Biometals*. 30, 217-235.
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E. 2008. Plant. ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in plant science*. 13, 151-159.
- Vincent, R.C. e Meguro, M. 2008. Influence of soil properties on the abundance of plant species in ferruginous rocky soils vegetation, southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 31:377-388.
- Wang, F., Wang, M., Guo, C., Wang, N., Li, X., Chen, H., Dong, Y., Chen, X., Wang, Z., Li, H. 2016. Cloning and characterization of a novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda corniculata*. *Genet Mol. Res* 15.
- 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.
- Wang, Y.; Yang, R.; Feng, Y.; Sikandar, A.; Zhu, X.; Fan, H.; Liu, X.; Chen, L.; Duan, Y. 2020. iTRAQ-Based Proteomic Analysis Reveals the Role of the Biological Control Agent, *Sinorhizobium fredii* Strain Sneb183, in Enhancing Soybean Resistance Against the Soybean Cyst Nematode. *Frontiers in plant science*.

- Whiting, S. N., Reeves, R. D., Richards, D., Johnson, M. S., Cooke, J. A., Malaisse, F., Paton, A., Smith, J., Angle, J., Chaney, R., Ginocchio, R., Jaffre, T., Johns, R., McIntyre, T., Purvis, O., Salt, D.E., Schat, H., Zhao, F. J., Baker, A. 2004. Research Priorities for Conservation of Metallophyte Biodiversity and their Potential for Restoration and Site Remediation. *Restor Ecol.* 12:106–116. doi: 10.1111/j.1061-2971.2004.00367.x
- Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q., Cai, Y. 2019. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *BioMed research international*.
- Yadav, S. 2010. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany.* 76, 167-179.
- Yang, C., Zhou, Y., Fan, J., Fu, Y., Shen, L., Yao, Y., Li, R., Fu, S., Duan, R., Hu, X. 2015. SpBADH of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* strongly confers drought tolerance through ROS scavenging in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry.* 96, 377-387.
- Yang, X., Liu, J., Xu, J., Duan, S., Wang, Q., Li, G., Jin, L. 2019. Transcriptome profiling reveals effects of drought stress on gene expression in diploid potato genotype P3-198. *International journal of molecular sciences.* 20, 852.
- Yu, F.; Han, X.; Geng, C.; Zhao, Y.; Zhang, Z.; Qiu, F. 2015. Comparative proteomic analysis revealing the complex network associated with waterlogging stress in maize (*Zea mays* L.) seedling root cells. *Proteomics.* v. 15, p. 135-147.
- Yu, T., Liu, C., Lu, X., Bai, Y., Zhou, L., Cai, Y. 2019. ZmAPRG, an uncharacterized gene, enhances acid phosphatase activity and Pi concentration in maize leaf during phosphate starvation. *Theoretical and applied genetics.* 132, 1035-1048.
- Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti M. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrante plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis.* 27(13):2782±6.
- Zappi DC. Paisagens e Plantas de Carajás/Landscapes and Plants of Carajas. Belém: Instituto Tecnológico Vale; 2017.
- Zappi, D.C.; Gastauer, M.; Ramos, S.; Nunes, S.; Caldeira, C.F.; Souza-Filho, P.W.; Guimarães, T.; Giannini, T.C.; Viana, P.L.; Lovo, J.; et al. Plantas Nativas Para Recuperação de Áreas de Mineração Em Carajás; Instituto Tecnológico Vale: Belém, Brazil, 2018; ISBN 978-85-943650-4-0.

- Zhang, H.; Zhang, X.; Liu, J.; Niu, Y.; Chen, Y.; Hao, Y.; Zhao, J.; Sun, L.; Wang, H.; Xiao, J.; Wang, X. 2020. Characterization of the Heavy-Metal-Associated Isoprenylated Plant Protein (HIPP) Gene Family from Triticeae Species. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6191. <https://doi.org/10.3390/ijms21176191>
- Zhang, L., Gao, M., Hu, J., Zhang, X., Wang, K., Ashraf, M. 2012. Modulation role of abscisic acid (ABA) on growth, water relations and glycinebetaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *International journal of molecular sciences.* 13, 3189-3202.
- Zhang, Y.; Li, Y.; Hassan, M.J.; Li, Z.; Peng, Y. 2020. Indole-3-acetic acid improves drought tolerance of white clover via activating auxin, abscisic acid and jasmonic acid related genes and inhibiting senescence genes. *BMC plant biology.* 20, 1-12.
- Zhao, D., Li, T., Wang, J., Zhao, Z. 2015. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: evidence from RNA-seq data. *Microbiological research.* 170, 27-35.
- Zhou, J., Jiao, F., Wu, Z., Li, Y., Wang, X., He, X., Zhong, W., Wu, P. 2008. OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiology.* 146, 1673-1686.

6. ANEXO I: Artigo publicado incluindo dados do capítulo I.

Article

Proteomic Profiling and Rhizosphere-Associated Microbial Communities Reveal Adaptive Mechanisms of *Dioclea apurensis* Kunth in Eastern Amazon's Rehabilitating Minelands

Sidney Vasconcelos do Nascimento ^{1,2}, Paulo Henrique de Oliveira Costa ¹, Hector Herrera ³ ,
Cecílio Frois Caldeira ¹ , Markus Gastauer ¹, Silvio Junio Ramos ¹ , Guilherme Oliveira ¹ 
and Rafael Borges da Silva Valadares ^{1,*} 

- ¹ Instituto Tecnológico Vale, Rua Boaventura da Silva 955, Belém CEP 66050-090, Brazil; sidney.nascimento@pq.itv.org (S.V.d.N.); paulo.henrique.costa@pq.itv.org (P.H.d.O.C.); cecilio.caldeira@itv.org (C.F.C.); markus.gastauer@itv.org (M.G.); silvio.ramos@itv.org (S.J.R.); guilherme.oliveira@itv.org (G.O.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém CEP 66075-110, Brazil
- ³ Departamento de Ciencias Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco 4811230, Chile; hector.herrera@ufrofrontera.cl
- * Correspondence: rafael.borges.valadares@itv.org



Citation: Nascimento, S.V.d.; Costa, P.H.d.O.; Herrera, H.; Caldeira, C.F.; Gastauer, M.; Ramos, S.J.; Oliveira, G.; Valadares, R.B.d.S. Proteomic Profiling and Rhizosphere-Associated Microbial Communities Reveal Adaptive Mechanisms of *Dioclea apurensis* Kunth in Eastern Amazon's Rehabilitating Minelands. *Plants* **2022**, *11*, 712. <https://doi.org/10.3390/plants11050712>

Academic Editors: Freddy Mora-Poblete and Eliemar Camprostrini

Received: 20 January 2022

Accepted: 27 February 2022

Published: 7 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Dioclea apurensis* Kunth is native to ferruginous rocky outcrops (known as *canga*) in the eastern Amazon. Native *cangas* are considered hotspots of biological diversity and have one of the largest iron ore deposits in the world. There, *D. apurensis* can grow in post-mining areas where molecular mechanisms and rhizospheric interactions with soil microorganisms are expected to contribute to their establishment in rehabilitating minelands (RM). In this study, we compare the root proteomic profile and rhizosphere-associated bacterial and fungal communities of *D. apurensis* growing in *canga* and RM to characterize the main mechanisms that allow the growth and establishment in post-mining areas. The results showed that proteins involved in response to oxidative stress, drought, excess of iron, and phosphorus deficiency showed higher levels in *canga* and, therefore, helped explain its high establishment rates in RM. Rhizospheric selectivity of microorganisms was more evident in *canga*. The microbial community structure was mostly different between the two habitats, denoting that despite having its preferences, *D. apurensis* can associate with beneficial soil microorganisms without specificity. Therefore, its good performance in RM can also be improved or attributed to its ability to cope with beneficial soil-borne microorganisms. Native plants with such adaptations must be used to enhance the rehabilitation process.

Keywords: abiotic stress; proteomic; rehabilitating minelands; rhizosphere; symbiosis

1. Introduction

Iron ore extraction in the eastern Amazon occurs mainly in ferruginous mountain outcrops surrounded by rainforests in the Carajás mineral province, covering some of the largest iron reservoirs of the world [1]. This ecosystem is characterized by a high plant diversity that forms different phytophysiognomies known as *canga* [2]. The plant communities that grow in *canga* are subjected to adverse environmental conditions such as intense ultraviolet (UV) radiation, high temperatures (soil and air), which, combined with constant winds, increase evapotranspiration processes [3]. At the same time, water acquisition is hampered by poor water-holding capacity influenced by soil composition and shallow soil formation, which tends to intensify the effects of water deficit [2,3]. Additionally, the oxidic soils from *canga* are characterized by low availability of soluble phosphorus (P) caused by high adsorption of P to iron and aluminum oxides [4]. Plants require several adaptations to grow and colonize such ecosystems. A robust adaptive

metabolism and symbiotic associations with soil microorganisms can lead to a successful establishment under these harsh environmental conditions.

Iron mining in Brazil occurs essentially in open-cast mines, including those in the Carajás mineral province [5]. The areas of iron ore extraction are characterized by the removal of vegetation and soil, and steep slopes [6]. Recent studies have evaluated different plants in the rehabilitation of areas affected by iron mining in the Amazon, including the reintroduction of native species [7]. These species have a crucial role in the success of mineland rehabilitation, reducing local biodiversity loss and contributing to the progressive recovery of ecological services associated with *canga*. Considering that revegetation is a fundamental technique for the rehabilitation of minelands, there is a need to identify native species able to cope with the stressful environmental conditions of post-mining areas in *canga* and understand the adaptive mechanisms used by such plants [7–9].

Plants from the genus *Dioclea* (Fabaceae) can grow in nearby mining areas in *canga* [10]. Considered a metallophyte species, *Dioclea apurensis* Kunth was listed as one of the most promising plants for mineland rehabilitation [11]. *D. apurensis* has been frequently used for the revegetation of waste piles and open-cast mines in rehabilitating minelands (RM) projects due to the ease of finding in native *canga* ecosystems, high seed production, and rapid growth [12]. However, the molecular mechanisms underlining the establishment of this species in RM have been scarcely explored.

Symbiosis with soil-borne microorganisms is a crucial step to promote the plant colonization of post-mining areas [13,14]. In the rhizosphere (soil section in contact with the plant roots), several microbial taxa are influenced by the plant metabolism, many of which have plant growth promoting traits that are useful to improve the plant establishment and growth under harmful ecosystems such as RM [15,16]. The mechanism by which the rhizosphere-associated microbial communities support the plant growth include production of plant growth regulators, improved water acquisition, direct nutrient solubilization, protection against phytopathogens, promotion of abiotic stress tolerance, among others [17,18]. Therefore, understanding how native plants interact with microorganisms inhabiting the soil substrate is key to characterize the beneficial symbiosis in rehabilitating Amazonian *cangas*.

Despite recognizing the importance of reintroducing native species for mineland rehabilitation, few studies analyze the protein profile of native plants used in rehabilitation programs and the interaction with microbiological communities in plants growing in post-mining areas. The aims of this study were: (i) to analyze the protein profile of *D. apurensis* roots from plants growing in RM; and (ii) to identify rhizosphere microorganisms that contribute to the adaptation of *D. apurensis* in RM. For this, we compare the protein profiles and rhizosphere-associated microorganisms from plants growing in *canga* (their natural distribution habitat) and from plants growing in the RM.

2. Results

2.1. Physical and Chemical Properties of Canga and Mining Area Soil Substrates

The soil substrates of RM showed a greater proportion of clay, while *canga* soils showed higher proportions of sand (Table 1). The soils from *canga* were more acidic than RM soils (Table 1). *Canga* soils showed more organic matter content than soils from RM (Table 1). Total nitrogen (N) was higher in *canga* soils, whereas available P was higher in RM soil substrates (Table 1). The concentrations of metals differs between environments; copper and iron were higher in *canga* soils, whereas manganese and zinc were higher in RM soils (Table 1).

Table 1. Physical and chemical characteristics of soils associated with *Dioclea apurensis* growing in *canga* and rehabilitating minelands (RM). Soil results are mean $\pm$ standard deviation for $n = 5$.

	RM	<i>Canga</i>
Clay (g kg ⁻¹)	486.7 $\pm$ 37.2	287.5 $\pm$ 103
Silt (g kg ⁻¹)	158.3 $\pm$ 40.8	87.5 $\pm$ 75
Sand (g kg ⁻¹)	355 $\pm$ 68.9	625 $\pm$ 177
pH H ₂ O	6.1 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.6
pH CaCl ₂	5.3 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3
Available P (mg dm ⁻³)	19.5 $\pm$ 15.9	1 $\pm$ 0.9
Total N (dag kg ⁻¹)	0.1 $\pm$ 0.06	0.4 $\pm$ 0.3
Organic matter (dag kg ⁻¹)	1.4 $\pm$ 0.6	7.7 $\pm$ 0.9
Na (mg dm ⁻³)	4.7 $\pm$ 0.6	11.4 $\pm$ 6.2
K (mg dm ⁻³)	22.6 $\pm$ 6.8	22.7 $\pm$ 6.8
B (mg dm ⁻³)	0.1 $\pm$ 0.03	0.2 $\pm$ 0.08
Cu (mg dm ⁻³)	0.6 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.5
Fe (mg dm ⁻³)	11.3 $\pm$ 6.3	372 $\pm$ 92
Mn (mg dm ⁻³)	59.7 $\pm$ 9.4	2.8 $\pm$ 1.5
Zn (mg dm ⁻³)	2.1 $\pm$ 1.6	1.4 $\pm$ 0.9

2.2. Protein Profiles, Annotation, and Functional Enrichment

A total of 1401 proteins were successfully identified and quantified, with 396 showing significant differential abundance ($p < 0.05$) between the roots from both environments (Dataset S1), being more abundant in roots from *canga*. Only two proteins were exclusively detected in the roots from RM, while 19 were identified only in the roots from *canga* (Dataset S1). Within the total proteins identified, 291 showed higher levels in roots from *canga*, while 105 were showed higher levels in roots from RM. The principal component analysis (PCA) of the 1401 proteins (Figure 1a) and 396 filtered proteins (Figure 1b) showed the separation between root samples from *canga* and roots from RM.

The enrichment analysis showed that the most accumulated proteins in *canga* act in 44 main processes, while the most accumulated proteins in RM participate in at least 20 processes (Figure 1c). In the roots from both sampling sites, the most prominent categories included proteins involved in response to stimuli, mainly related to abiotic stresses, and proteins involved in growth and reproduction, including proteins involved in carbon metabolism and biosynthesis of secondary metabolites (Figure 1c). Proteins involved in these pathways, especially in secondary metabolite biosynthesis, including amino acid biosynthesis, and carbon metabolism, were more accumulated in *canga*. Figure S1a,b show the 40 main biological processes from the functional annotation of the most accumulated proteins in the roots from *canga* and RM, respectively.

2.3. Protein–Protein Interactions (PPI)

The analysis of PPI showed 178 proteins with higher levels in the roots from *canga* (Figure 2, Dataset S2) and 69 proteins in the roots from RM (Figure 2, Dataset S2). The enrichment and PPI analysis showed an essential co-occurrence of a large part of the proteins accumulated in plants of each environment. These proteins were grouped into three highly interacting protein clusters, with a PPI enrichment p -value of 1×10^{-16} in *canga* plants and p -value $< 1.4 \times 10^{-6}$ in RM plants (Figure 2, Dataset S2).

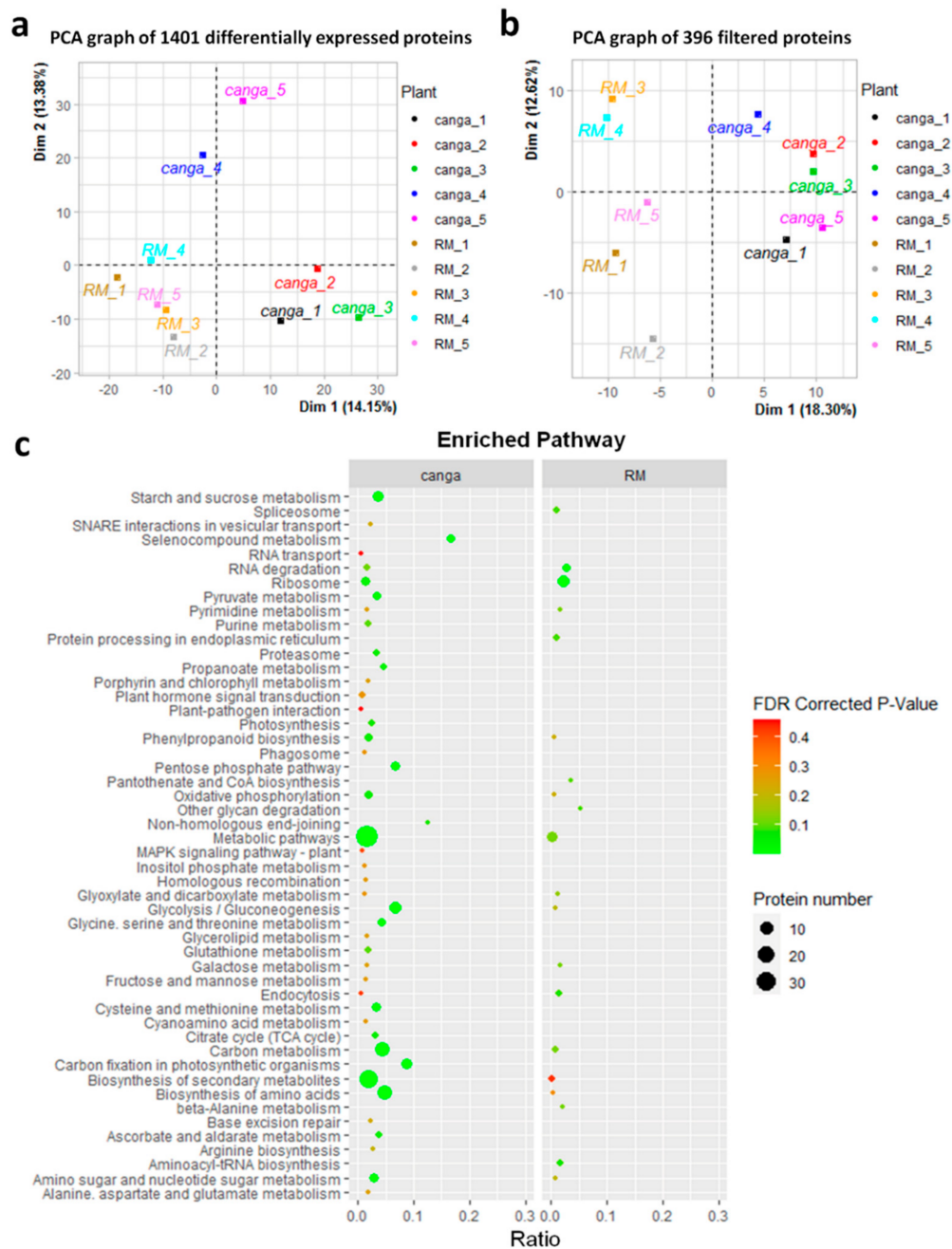


Figure 1. PCA and enrichment analysis of the proteins with differential abundances in *D. apurensis* roots sampled from *canga* (*canga*) or in rehabilitating mineland (RM). (a) PCA of 1401 differentially accumulated proteins comparing five plants from *canga* with five from RM. (b) PCA of differentially accumulated and filtered proteins based on $p < 0.05$ and fold change ≥ 1.5 . (c) Enrichment analysis of the most accumulated proteins in different biological processes. The significantly enriched KEGG pathways were indicated as dots (FDR corrected $p < 0.05$, Fisher's exact test, Benjamini and Hochberg FDR correction method). The dot sizes represent the number of proteins included in each pathway. The x-axis represents the ratio of the number of differentially accumulated proteins and the number of all proteins in the pathway.

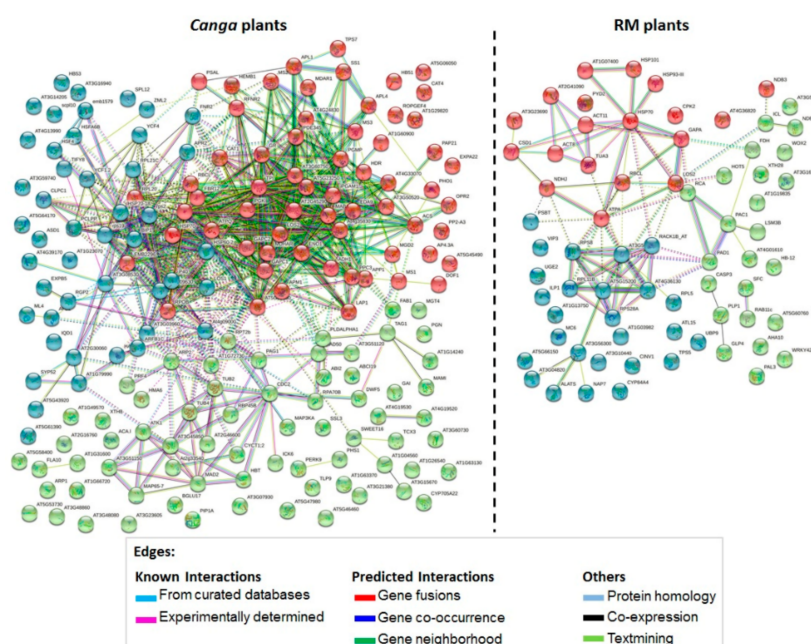


Figure 2. Protein–protein interaction network of the proteins with differential abundances in *D. apurensis* in *canga* (to the left) and RM (to the right) separated into 3 K-means clusters illustrated in different colors. The proteins used for analysis are presented in Dataset S2. Gene symbols were obtained using homologous proteins from the *Arabidopsis thaliana* database from uniprot.org, accessed on 10 October 2021. Edges represent protein–protein interactions as described in the figure. Number of edges between in *canga* plants: 697. Number of edges between RM plants: 54. Dotted lines represent edges between clusters. PPI enrichment *p*-value in *canga* plants: 1×10^{-16} . PPI enrichment in RM plants: $<1.4 \times 10^{-6}$.

In *canga* plants, the functional enrichment analysis showed that the cluster in red includes 63 proteins mainly involved in energy metabolism and secondary metabolite biosynthesis, including amino acid biosynthesis. The green cluster comprised 69 proteins related to the cell cycle and response, especially abiotic stresses such as osmotic stress. The blue cluster contains 46 proteins, mainly including binding proteins such as nucleic acid binding proteins, structural components of ribosomes, and protein folding. In RM plants, the red cluster was composed of 19 proteins related to abiotic stimuli, especially temperature. The cluster in green contains 24 proteins categorized by the functional enrichment analysis of the term “cellular anatomical entity”, which includes proteins involved in carbon metabolism and biosynthesis of secondary metabolites. The 26 proteins included in the blue cluster of plants on RM were categorized mainly into cellular processes such as gene expression and protein metabolic process (Figure 2, Dataset S2).

2.4. Microbial Diversity

The ITS2 sequencing produced 3,948,832 raw reads across 16 input libraries. After quality filtering, 2,760,666 amplicon sequences were selected. The number of fungal OTUs in each sample ranged from 359 to 789 and was on average 563 (Table S1). *Canga* soils showed more fungal sequences (1,404,745; comprising 521 ± 132 OTUs) than RM (1,355,921; comprising 605 ± 97 OTUs). Additionally, rhizosphere soil samples presented more sequences (1,531,425; comprising 634 ± 116 OTUs) than the bulk soil samples (1,229,241; comprising 492 ± 78 OTUs). The Shannon and Simpson diversity indexes of fungal sequences were higher in RM, with higher values in the bulk soil substrates of RM samples (Figure 3).

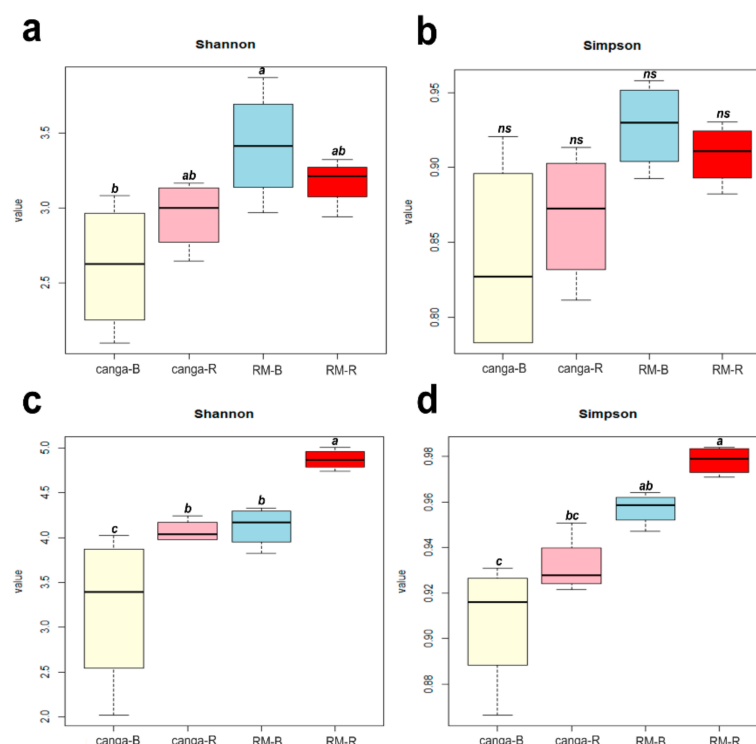


Figure 3. Alpha diversity (Shannon and Simpson) indices of sequences in rhizospheric and bulk substrates associated with *D. apurensis* growing in *canga* or rehabilitating minelands (RM). (a,b) Indices of fungal 18S rRNA. (c,d) Indices of bacterial 16S rRNA. canga_B and RM_B, bulk substrate; canga_R and RM_R, rhizospheric substrate. Different lowercase letters indicate statistical differences ($p > 0.05$); ns = not significant).

The 16S sequencing produced 4,208,259 raw reads across 16 input libraries. After quality filtering, 1,361,859 sequences were considered. The number of bacterial OTUs ranged from 205 to 996 and was on average 579 (Table S2). The soils from RM showed a higher number of sequences (769,122; comprising 723 ± 240 OTUs) than *canga* (592,737; comprising 435 ± 190 OTUs), whereas more bacterial sequences were detected in the bulk soils (750,740; comprising 601 ± 366) than in the rhizosphere soils (611,119; comprising 556 ± 76 OTUs). The Shannon and Simpson diversity indexes were higher in the RM samples, with higher values in the rhizospheric substrate samples (Figure 3).

In *canga*, the analysis of fungal sequences showed Ascomycota and Basidiomycota as the most abundant phyla in the rhizosphere and bulk soils (Figures S2 and S3, Table S3). Glomeromycota was also detected in bulk soil samples (Figures S2 and S3, Table S3). Regarding bacterial sequences, Acidobacteria, Proteobacteria, and Actinobacteria were the three most abundant phyla in the rhizosphere and bulk soils (Figures S2 and S3, Table S3).

In RM, the analysis of fungal sequences revealed Ascomycota, Basidiomycota, and Glomeromycota as the most dominant phyla in the rhizosphere and bulk soil substrate (Figures S2 and S3, Table S3). Proteobacteria, Acidobacteria, and Actinobacteria were the more abundant phyla in both the rhizosphere and bulk soil substrates (Figures S2 and S3, Table S3).

A heatmap based on OTU abundance indicates differences between the structure of the microbial communities associated with plants in both ecosystems (RM and native *canga*) (Figure 4a,c). PCoA and cluster analyses of microbial community structure among the different samples showed that microbial communities were distinct between RM and native *canga*. Microbial communities also differed when comparing rhizospheric and bulk soil from *canga* (considering both fungal and bacterial populations) but not in RM (Figure 4b,d).

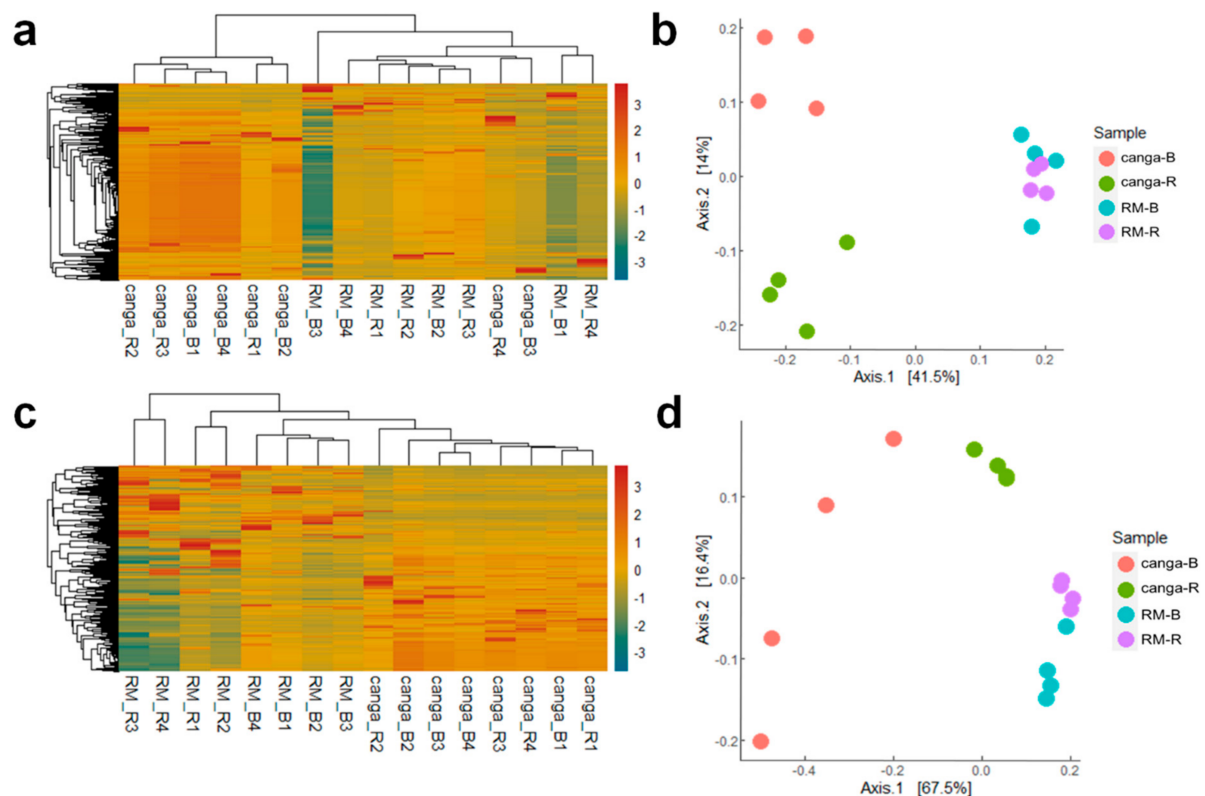


Figure 4. Heatmap and principal coordinate analysis for cumulative sum scaling (CSS)-normalized counts of the fungal 18S rRNA and bacterial 16S rRNA gene sequences obtained from substrates from *D. apurensis* growing in *canga* or rehabilitating minelands (RM). *canga_B* and *RM_B*, bulk substrate; *canga_R* and *RM_R*, rhizospheric substrate. (a,b) Heatmap showing differences between fungal 18S rRNA (a) and principal coordinate analysis for cumulative sum scaling of fungal 18S rRNA (b). (c,d) Heatmap showing differences between bacterial 16S rRNA (c) and principal coordinate analysis for cumulative sum scaling of bacterial 16S rRNA (d).

Differences in the composition of microbial communities were estimated by calculating LEfSe scores at the family and genus levels. A total of 25 distinct fungal taxa were identified in plants established in *canga* or RM (Figure 5a). Most of these taxa were related to Ascomycota and Basidiomycota. Whereas a total of 29 preferential bacterial taxa were identified in plants growing in *canga* or RM, most of which were related to Proteobacteria and Actinobacteria (Figure 5b).

Seven trophic modes were predicted in the fungal OTUs, being the categories pathotroph_symbiotroph most abundant in the soils from *canga*, whereas the categories pathotroph_saprotroph_symbiotroph were most abundant in the soils from RM (Figure 6). Similarly, 36 predicted functions were identified in the bacterial OTUs, being the function nitrogen fixation and nitrate reduction more abundant in both soils but higher in the RM (Figure 6).

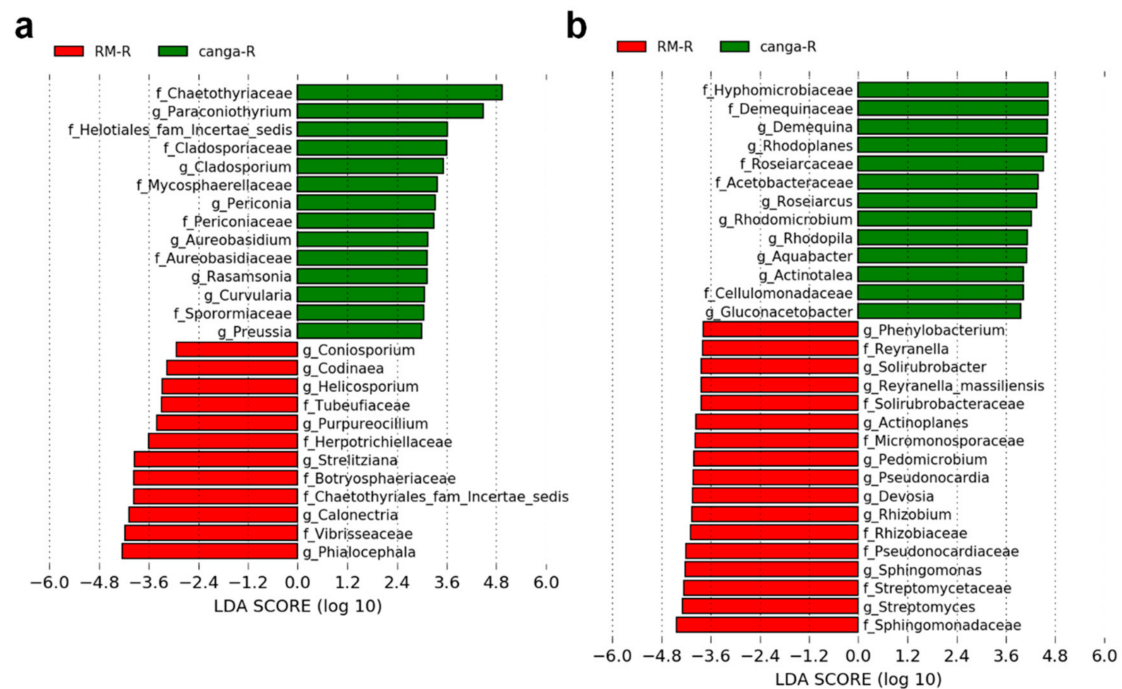


Figure 5. Linear discriminant analysis (LDA) of effect size (LEfSe) to identify preferential taxa in the rhizosphere of plants identified in *canga* (*canga*) or in the rehabilitating minelands (RM). (a) Preferential fungal 18S rRNA sequences and (b) preferential bacterial 16S rRNA sequences.

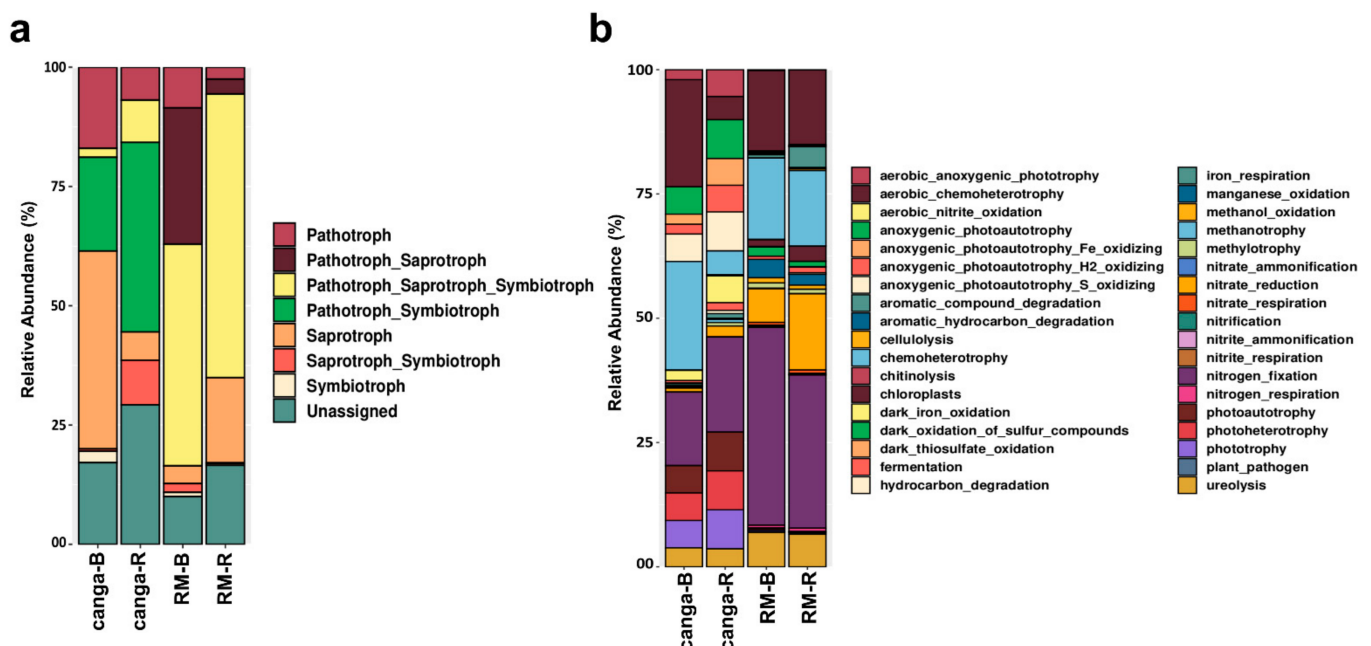


Figure 6. Functional analysis of the communities of 18S rRNA (a) and bacterial 16S rRNA (b) obtained from *Dioclea apurensis* rhizosphere from plants growing in a *canga* ecosystem (*canga*) or a rehabilitating mineland (RM) in Serra dos Carajás, eastern Amazon.

3. Discussion

In this study, the proteomic approach has revealed the differential abundances of proteins related to metabolic pathways involved in response to the abiotic stress conditions of both native *canga* and RM. Together, the functional annotation, enrichment, and PPI analyzes showed the co-occurrence of a large part of the essential proteins accumulated in

plants growing in each ecosystem and include those related to responses to oxidative stress, drought, P deprivation, excess iron, and symbiosis. Thus, the readiness of a molecular machinery joined to specific rhizosphere-associated fungal and bacterial communities inhabiting the rhizosphere can be considered crucial for establishing this native plant in RM in the eastern Amazon.

3.1. Physical and Chemical Properties of Canga and Mining Area Soil Substrates

Alteration in the normal levels of reactive oxygen species (ROS) is one of the main metabolic responses observed in plants growing under stressful environmental conditions [19]. In order to mediate the balance of ROS, the removal system relies on the action of enzymatic and non-enzymatic antioxidants [20]. In this study, proteins involved in synthesizing enzymatic antioxidants such as superoxide dismutase, peroxidases, catalases, glutathione reductase, and monodehydroascorbate reductase showed more abundance in the roots from *canga* (Dataset S1). Additionally, the non-enzymatic antioxidant systems proline-rich receptor protein kinase and betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) were more accumulated in the roots from *canga* (Dataset S1). Such results reveal the abundances of proteins involved in the antioxidant system, especially in the roots growing under the severe conditions of *canga*, which also are identified in plants growing in RM.

3.2. Proteins Involved in the Response to Water Deficit

Two types of aquaporins showed more abundance in plants from *canga*, including aquaporin PIP1-1 and water stress-induced tonoplast intrinsic protein (Dataset S1), which play a regulatory role in the cellular transport of water in plasma membranes and tonoplasts, respectively [21]. These proteins have been described as essential for improving plant growth, water deficit tolerance, and osmotic balance [22,23]. Roots from *canga* showed higher levels of proteins involved in abscisic acid (ABA) transport and signaling (i.e., phosphatase 2C, ABC transporter, ATP-binding protein, ABC transporter B, and ABC transporter I), as well as proteins involved in signaling by serine/threonine kinase (i.e., phospholipase D alpha 1, proline-rich receptor-like protein kinase and receptor-like protein kinase S) than roots from RM (Dataset S1). ABA has been classified as a versatile phytohormone involved in plant signaling in response to drought stress [24]. Under conditions of water deficit (a common characteristic of *canga* ecosystems), there is also a high level of phosphatase 2C (PPC2)-type proteins, which acts on the dephosphorylation of SnRK2, maintaining optimal ABA levels during water deficit [25], which agree with the results obtained in the roots from plants growing in *canga*.

High levels of osmolytes such as glycine betaine (GB), which is synthesized in a pathway in which BADH acts as a critical enzyme, has been recently described in plants growing under abiotic stress, including the water deficit [26], contributing to a higher relative water content, the integrity of cell membranes, stabilization of proteins, and detoxification [27]. The relationship of high levels of BADH biosynthesis with the increase in GB levels and greater tolerance to water deficit has already been observed in plants such as *Arabidopsis thaliana* [27], *Sesuvium portulacastrum* [28], and *Zea mays* [29]. In addition to BADH, roots from *canga* showed higher levels of proline-rich receptor-like protein kinase and spermidine synthase (Dataset S1). These proteins have been considered essential components of the cell membrane, playing essential roles in signal transduction in response to drought and stomata activity to prevent water loss [30,31]. The greater abundance of these water deficit-responsive proteins in roots from *canga* indicates that *D. apurensis* have developed adaptive mechanisms to resist extensive drought periods in *canga* and help resist the drought events in RM.

3.3. Proteins Involved in the Response to Metal Stress

Metal stress directly influences the establishment and growth of plants in mining areas. In fact, soils from *canga* showed higher levels of Fe (Table 1). High levels of metals in the soil solution can activate distinct signaling pathways such as cadmium-dependent,

mitogen-activated protein kinase, ROS, and phytohormones, enhancing the expression of transcription factors or stress-responsive genes [32]. Most of these proteins were more accumulated in roots from *canga* (Dataset S1). Protein kinases, calmodulins, and calcium-dependent protein kinases have been described as receptors capable of activating signaling networks in the tolerance to the excess of metals [33,34].

Additionally, Glutathione-related proteins are directly involved in the balance of metals in the intracellular medium, a process that has been described in *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*, and *Beta vulgaris* [35,36]. These results also agree with Jiang et al. [37], who reported a direct role of heat shock proteins (HSP70) in the contribution of tolerance to metal stress in *Rosa hybrida*. Such proteins were more accumulated in roots from *canga* (Dataset S1). Similarly, proteins related to the biosynthesis of compounds commonly detected in plants growing under metal stress, such as phenylalanine ammonia-lyase and nicotianamine synthase, were detected in this study (Dataset S1) [38–40]. Additionally, ferritin was also more accumulated in roots from *canga*, and their role in cytoplasmatic sequestration of soluble iron [38,39] can contribute to the diminishing of the negative effects of the metal in *D. apurensis*.

3.4. Proteins Involved in the Response to P-Starvation

According to this study, P levels in RM were higher than in *canga* (Table 1). The higher concentration of P in RM can be explained by hydroseeding containing NPK fertilization in these sites. Phosphorus deficiency in *canga* can be related to the formation of complexes between P and iron oxides, limiting plant uptake availability [41]. Roots from plants sampled in *canga* showed more proteins related to P depletion, such as monogalactosyldiacylglycerol synthase 2, phospholipase, alcohol dehydrogenase, extracellular purple acid phosphatases, and antioxidant system proteins such as catalases and monodehydroascorbate reductases [42–44]. During Pi deprivation, glycolipids are transferred to extraplastid membranes, where they replace degraded phospholipids to meet the need for Pi essential for various biological processes in the cell. This membrane remodeling occurs in a process dependent on the activation of monogalactosyldiacylglycerol synthase induced by a low Pi level. Studies have already observed this pattern in leaves and roots with different plant species under Pi depletion, including *Sesamum indicum*, *Zea mays*, and *Arabidopsis thaliana* [42,45,46].

Additionally, three phospholipase D alpha-1 proteins were also more accumulated in roots from *canga* (Dataset S1). Phospholipase induction has been observed in studies with plants during P starvation [43]. These proteins are involved in P storage and induction of root growth to tolerate P scarcity conditions [43], such as in *canga*. In this sense, *D. apurensis* from *canga* synthesize proteins that support the growth under low P levels or induce mineralization from the soil substrate in *canga*. This study showed that alcohol dehydrogenase (ADH) was more accumulated in roots from *canga* (Dataset S1). The increase in ADH levels is in line with the results observed in studies with different plant species growing under P shortage. The high levels of this protein is observed together with increases in glycolysis and fermentation intermediaries, possibly related to cell expansion in Pi-limitation [47,48]. In acidic and Fe-rich soil substrates, such as the *canga* ecosystems, P can form complexes with iron oxides in an inaccessible form for absorption by plant roots [44]. This study identified extracellular purple acid phosphatases in roots from *canga* (Dataset S1). These proteins belong to a group of hydrolases induced by P deficiency, acting in recycling P from esters and anhydrides [44]. Additionally, P scarcity in *canga* soil substrates can induce ROS formation, which was also observed in the roots from *canga* (Dataset S1) participating in the signaling of cellular responses and protein biosynthesis involved in adaptations to P starvation [49]. Under both conditions, the roots expressed transcription factors commonly reported under P shortage, including MYB, WRKY, and HLH (Dataset S1), which regulate the expression of target genes and define metabolic responses to P starvation [50,51]. The set of proteins accumulated in plants growing in *canga* should contribute to the adaptation

of *D. apurensis* in this ecosystem, although there are still no impediments to its development in environments with optimal P levels as in RM.

3.5. Proteins Involved in Symbiosis

Under abiotic stress, plants depend on beneficial soil microorganisms to become established in harmful environments such as *canga*. In this study, the analyses have detected several proteins involved in the establishment of symbiosis with bacteria and fungi, including nodulins [52], monodehydroascorbate ascorbate reductase [53], and enzymes involved in the ascorbate-glutathione cycle [54]. These enzymes were detected in the roots from both ecosystems, with higher levels in the roots from *canga* (Dataset S1). The nodulation in *D. apurensis* has been observed in recent studies with depletion of nutrients such as N [7]. Considering the successful establishment of *D. apurensis* in *canga*, these species contribute to maintaining essential soil processes such as N fixation during mineland rehabilitation [7,55]. The higher levels of symbiosis-related proteins in the roots from *canga* than from RM is explained by the higher diversity of plant species found in *canga* ecosystems and their corresponding effect on soil microbial communities.

3.6. Rhizosphere-Associated Microbial Communities

The rhizosphere-associated fungal and bacterial community analysis showed that specific taxa are enriched in the rhizosphere of *D. apurensis*. Proteobacteria and Ascomycota were the most abundant bacterial and fungal phyla, respectively, in both rhizosphere and bulk soil substrates (Figure 5). Recent studies have reported similar results in plants growing in ecosystems affected by mining activities, where the soil microbial communities and specific mechanisms of abiotic stress tolerance can be considered key to promoting the phytostabilization towards rehabilitation of ecosystems services [8,56]. Among the preferential microorganisms identified in this study, several beneficial saprophytic, free-living, symbiotic, and endophytic taxa were directly identified in the rhizospheric soil, especially in plants from *canga*, where specific fungal and bacterial taxa belonging to plant growth-promoting microorganisms were detected (e.g., *Paraconiothyrium*, *Rasamsonia*, *Scytalidium*, *Rhodoplanes*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Roseiarcus*, and *Actinotalea*) (Table S3; Figure 5). Such results agree with recent studies analyzing the diversity of microbial communities associated with plants growing under stressful environmental conditions, where specific rhizosphere-associated microorganisms have been described as essential to promote plant establishment [57,58]. This study has also detected a higher microbial diversity in plants from RM (especially fungal taxa), which can be related to the presence of widespread soil microorganisms inhabiting the RM soil substrates, with competition-mediated co-existence, latent soil microbes, and low influence of plant species on the soil microbiota (compared to native *canga*). However, the predicted functions of microorganisms involved in N-fixation were more abundant in RM than *canga* (Figure 6), showing that low specificity for microbial taxa can also be a characteristic supporting the establishment of this species in RM.

The rhizosphere-associated fungal and bacterial communities play an essential role in establishing native species in RM [59,60]. Additionally, several beneficial bacterial and fungal genera with key roles in nutrient solubilization, plant growth promotion, and defense against phytopathogens were detected (e.g., *Glomeromycetes*, *Sphingomonas*, *Actinotalea*, *Rhizobium*, *Rasamsonia*, *Paraconiothyrium*) [61–63]. Despite the higher diversity of rhizosphere-associated microorganisms identified in plants growing in RM, they were mostly different from those detected in *canga*, denoting that *D. apurensis* can associate with beneficial soil microorganisms inhabiting soil substrates in RM without an apparent specificity, similar to what has been described in *Mimosa acutistipula* [8]. Accordingly, the specific rhizosphere-associated microbial communities of *D. apurensis*, which is related to better performance under abiotic stress conditions in *canga* [64], must be considered in mineland rehabilitation projects to preserve essential microbe-mediated processes that can contribute to later successional stages of rehabilitation in Amazonian *canga*.

4. Materials and Methods

4.1. Soil Substrate Sampling and Chemical Analyses

Samples were collected at the end of the wet season (May 2018) in a native metalliferous savanna in Serra dos Carajás, Pará, northern Brazil. The sampling sites included: (i) a native herbaceous shrub *canga* ecosystem with minimal anthropogenic intervention (6°00'41.0" S 50°17'45.0" W); and (ii) a RM in waste piles of iron mining (6°02'32.0" S 50°07'04.0" W), where a revegetation program started in 2014. The application of *D. apurensis* seeds was carried out by hydroseeding containing NPK fertilization with 04-14-08 (8 kg for each 8 × 12 m of soil substrate).

The region's climate is tropical warm with a rainy season from November to March and a dry season from May to September, an average annual rainfall of 2033 mm, and temperatures varying between 25.1 °C and 26.3 °C [9,65]. Bulk soil samples (n = 5) were collected near *D. apurensis* roots naturally growing in *canga* and from *D. apurensis* growing in an RM project, at a depth of 10 cm, 5 m away from each plant considering zones without other plants. Rhizospheric soil (n = 5) was taken by gently shaking the soil substrate adhered to the root system from plants growing in *canga* and RM. The samples of bulk soil were submitted to chemical and physical analyses. After being air-dried, the samples were sieved using a 2 mm mesh. The pH was determined in a 1:2.5 soil substrate to water ratio, and the organic carbon content was determined using the potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) method. The available P, K, B, Zn, Fe, Mn, and Cu were determined using the Mehlich-1 method (0.05 mol L⁻¹ HCl + 0.0125 mol L⁻¹ H₂SO₄), S-SO₄⁻² by calcium phosphate monobasic at 0.01 M, and the total N content was determined using the Kjeldahl method [66]. The soil texture was determined as described by Kettler et al. [67].

4.2. Root Sampling and Protein Isolation

Roots from five *D. apurensis* individual plants were collected at each sampling site, kept in a cold phenol/SDS (sodium dodecyl sulfate) buffer, and transported to the laboratory for further processing. Protein isolation, determination of protein concentrations, and further processing were performed according to the protocol proposed by do Nascimento et al. [68], with minor modifications (Table S4).

4.3. Proteome Analysis

The identification and quantification of proteins were performed in a nanoACQUITY UPLC[®] ultra-performance liquid chromatography (Milford, MA, USA), configured for fractionation in two dimensions as reported in Herrera et al. [69]. Five micrograms of the peptides were analyzed with five analytical replicates. The first dimension used a 5 µm XBridge BEH130 C18 (300 µm × 50 mm) and a Symmetry C18 5 µm (180 µm × 20 mm) trapping column at a flow rate of 2000 µL min⁻¹. The second dimension used a 1.7 µm BEH130 C18 1.8 µm (100 µm × 100 mm) analytical column, at a flow rate of 400 µL min⁻¹. The samples were separated in five fractions with a gradient of 10.8, 14.0 16.7, 20.4, and 65.0% acetonitrile. The chromatograph was coupled to a NanoLock ESI-Q-ToF SYNAPT G2-S (Waters) mass spectrometer. The acquisition ranged from 50 to 2000 Da, in MS^E mode (data independent analysis) at a scan rate of 0.5 s and an interscan delay of 0.1 s.

The data were processed using the Progenesis QI software (Waters) for identification and quantification, using the Viridiplantae database from UniProt (UniProtKB/swiss-prot, uniprot.org, accessed on 10 October 2021). Protein identification was accepted if the probability of identifying peptides was greater than 90% and proteins with 95%. The significance levels of the differential abundances of proteins were determined by applying the ANOVA test ($p < 0.05$). To compare the proteome of *D. apurensis* grown in *canga* or RM, a PCA of the proteins with differential abundances and with $p < 0.05$ were produced in the R software v3.6.3 (R Core Team 2018; <https://www.R-project.org>, accessed on 10 October 2021), using packages FactoMineR, Factoshiny, and Factoextra. The functional annotation of proteins was performed using the OmicsBox v1.2.4 (bioBam) and UniProt (UniProtKB/swiss-prot, uniprot.org, accessed on 10 October 2021). Kyoto Encyclopedia

of Gene and Genome (KEGG) pathway enrichment analysis for proteins was performed using the KOBAS software v3.0. [70] (kobas.cbi.pku.edu.cn, accessed on 10 October 2021) with *Arabidopsis thaliana* as the background species for the analysis. The R package ggplot2 was used for the enriched KEGG pathways visualization. The PPI networks were predicted based on functional analysis using the software STRING (research tool for recovering genes/proteins in interaction) v11.0 (<http://string-db.org/>, accessed on 10 October 2021), using homologous proteins from the *Arabidopsis thaliana* as the background species.

4.4. Microbial Diversity

Total DNA was extracted from 0.25 g of soil using the PowerSoil DNA Isolation Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's recommendations. The DNA concentration was determined with the Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the quality was verified in a 1 % electrophoresis agarose gel.

The amplicon libraries for bacteria and fungi were prepared according to Costa et al. [8], with minor modifications. The 16S rRNA gene was amplified by PCR using the bacterial primer set S-D-Bact-0341-b-S-17-N (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') and S-D-Bact-0785-a-A-21-N (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). After a hot start at 95 °C for 3 min, 35 PCR amplification cycles at 95 °C for 30 seg, 55 °C for 30 seg, and 72 °C for 30 seg were performed, followed by a final extension step at 72 °C for 5 min. The ITS region of the 18S rRNA gene was amplified by PCR using the primer set fITS7i (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGARTCATCGAATCTTTG-3') and ITS4i (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). After a hot start at 94 °C for 2 min, 35 PCR amplification cycles at 94 °C for 30 seg, 56 °C for 1 min, and 72 °C for 30 seg were performed, followed by a final extension step at 72 °C for 7 min.

The size and quality of the PCR fragments were estimated on an Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a DNA 1000 chip. The libraries were purified with the AMPure XP purification kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and further processed with the Nextera XT kit (Illumina, San Diego, CA, USA). The gene libraries were sequenced in a MiSeq-Illumina platform using a MiSeq V3 reagent kit (600 cycles; Illumina) in the human and medical genetics laboratory at Universidade Federal do Pará (Belém, PA, Brazil).

The ITS and 16S sequences were analyzed using the Pipeline for MetaBarcoding Analysis (PIMBA), which allows the analysis of metabarcodes based on the pipeline QIIME [71]. The low-quality sequences were filtered and trimmed using PRINSEQ v0.20.4, and forward and reverse sequences were merged using PEAR v0.9.19 [72]. Reads were dereplicated, singletons removed, and the sequences were truncated to 200 for fungi and 240 for bacteria. Chimeras were filtered, and the sequences were grouped into operative taxonomic units (OTUs) using VSEARCH v2.8.2. The taxonomic assignment was developed using the UNITE database for fungi and the Ribosomal Database Project for bacteria [73,74]. Graphs were constructed considering the alpha and beta diversity in R software using the ggplot2 and vegan packages. Beta diversity was calculated, and principal coordinate analysis (PCoA) graphs were constructed using the "weighted UniFrac distances" in R software using the phyloseq package. Heatmaps were constructed with the total abundance of OTUs using R software (packages pheatmap and phyloseq). Alpha diversity was estimated using the vegan package with the Shannon and Simpson diversity indices. Additionally, clustering analyses of the data were performed using an "hclust" function with the options "methods = ward.D2" and "method.dist = correlation" from the pvclust package in the R software. Permutational multivariate analysis of variance was applied using the function "adonis" (vegan package). Linear discriminant analysis (LDA) of effect size (LEfSe) was performed with the Kruskal–Wallis test, and the effect size was estimated with a logarithmic score of 2.0 in the LDA. Finally, the predicted ecological roles of the identified microbial

taxa were assigned using FUNGuild v1.1 [75] and FAPROTAX v1.2.4 [76] in Python v3.8.2. The data were plotted in the R software using the viridis, dplyr, and scales packages.

5. Conclusions

This study showed that *D. apurensis* growing in native *canga* have a set of proteins involved in the response to environmental stress to cope with the abiotic stress challenges. Its ability to increase the levels of a wide range of proteins in response to the challenging conditions of post-mining areas enhances *D. apurensis* establishment in rehabilitating minelands. Among them, the identification of proteins involved in the antioxidant system, response to water deficit, excess of metals, and deficiency of P. Additionally, our results confirm that *D. apurensis* establish interactions with beneficial microbial taxa without specificity. High levels of specific proteins involved in response to severe environmental conditions and interaction with key microbes at the rhizosphere are characteristics that can be identified in native species to select and diversify the plant species used for mineland rehabilitation.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants11050712/s1>. Figure S1: Top 40 categories obtained by functional annotation in different biological processes. (a) Most abundant proteins in *canga* plants and (b) the most abundant proteins in rehabilitating mineland (RM) plants; Figure S2: Relative abundance at the phylum level of major fungal (A) and bacterial (B) sequences associated with the rhizosphere (R) or bulk soil (B) of *Dioclea apurensis* growing in *canga* (*canga*) or a rehabilitating mineland (RM) in Serra dos Carajás, eastern Amazon (n = 4); Figure S3: Relative abundance at the genus level of major fungal (A) and bacterial (B) sequences associated with the rhizosphere (R) or bulk soil (B) of *Dioclea apurensis* growing in *canga* (*canga*) or a rehabilitating mineland (RM) in Serra dos Carajás, eastern Amazon (n = 4); Table S1: Fungal 18S rRNA sequences obtained in rhizospheric and bulk substrates samples from *Dioclea apurensis* growing in *canga* (*canga*) or rehabilitating minelands (RM); Table S2: Bacterial 16S rRNA sequences obtained in rhizospheric and bulk substrates samples from *Dioclea apurensis* growing in *canga* (*canga*) or rehabilitating minelands (RM); Table S3: Most abundant fungal and bacterial taxa identified in *Dioclea apurensis* soil substrates in plants from *canga* (*canga*) and rehabilitating minelands (RM). Numbers between parentheses are the relative abundance percentage (RA %) of each identified taxa; Table S4: Steps and procedures of protein extraction; Dataset S1: Protein report of 396 proteins with differential abundances in *canga* and RM plants filtered based on $p < 0.05$ and fold change ≥ 1.5 ; Dataset S2: PPI enrichment of *Dioclea apurensis* root proteins in STRING.

Author Contributions: Conceptualization, S.V.d.N. and R.B.d.S.V.; methodology, S.V.d.N., P.H.d.O.C. and R.B.d.S.V.; validation, S.V.d.N., P.H.d.O.C. and R.B.d.S.V.; formal analysis, S.V.d.N., P.H.d.O.C., C.F.C., H.H., S.J.R., M.G. and R.B.d.S.V.; resources, G.O. and R.B.d.S.V.; data curation, S.V.d.N. and P.H.d.O.C.; writing—original draft preparation, S.V.d.N.; writing—review and editing, S.V.d.N., C.F.C., R.B.d.S.V., H.H., M.G., P.H.d.O.C., S.J.R. and G.O.; supervision, R.B.d.S.V. and G.O.; funding acquisition, G.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Vale S.A., project “Canga Biodiversity and Ecosystem Services”. G.O. is a CNPq fellow and received funding from CAPES (88887.130628/2016-00), CNPq (444227/2018-0, 402756/2018-5, and 307479/2016-1), and the CABANA project (RCUK(BB/P027849/1)).

Data Availability Statement: The sequences obtained in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA690164>, accessed on 1 June 2021) under the accession number PRJNA690164. The proteomic data was submitted to Massive repository under the accession MSV000087423 (<https://massive.ucsd.edu/>, accessed on 1 June 2021).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- dos Santos, R.S.P.; Milanez, B. The Global Production Network for iron ore: Materiality, corporate strategies, and social contestation in Brazil. *Extr. Ind. Soc.* **2015**, *2*, 756–765. [\[CrossRef\]](#)
- Jacobi, C.M.; Do Carmo, F.F.; Vincent, R.C.; Stehmann, J.R. Plant communities on ironstone outcrops: A diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodivers. Conserv.* **2007**, *16*, 2185–2200. [\[CrossRef\]](#)
- Skirycz, A.; Castilho, A.; Chaparro, C.; Carvalho, N.; Tzotzos, G.; Siqueira, J.O. *Canga* biodiversity, a matter of mining. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 653. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lehmann, J.; da Silva Cravo, M.; de Macêdo, J.L.V.; Moreira, A.; Schroth, G. Phosphorus management for perennial crops in central Amazonian upland soils. *Plant Soil* **2001**, *237*, 309–319. [\[CrossRef\]](#)
- Gastauer, M.; Souza Filho, P.W.M.; Ramos, S.J.; Caldeira, C.F.; Silva, J.R.; Siqueira, J.O.; Neto, A.E.F. Mine land rehabilitation in Brazil: Goals and techniques in the context of legal requirements. *Ambio* **2019**, *48*, 74–88. [\[CrossRef\]](#)
- Carvalho, C.S.; Forester, B.R.; Mitre, S.K.; Alves, R.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Ramos, S.J.; Resende-Moreira, L.C.; Siqueira, J.O.; Trevelin, L.C.; Caldeira, C.F. Combining genotype, phenotype, and environmental data to delineate site-adjusted provenance strategies for ecological restoration. *Mol. Ecol. Resour.* **2021**, *21*, 44–58. [\[CrossRef\]](#)
- Ramos, S.J.; Gastauer, M.; Mitre, S.K.; Caldeira, C.F.; Silva, J.R.; Neto, A.E.F.; Oliveira, G.; Souza Filho, P.W.; Siqueira, J.O. Plant growth and nutrient use efficiency of two native Fabaceae species for mineland revegetation in the eastern Amazon. *J. For. Res.* **2020**, *31*, 2287–2293. [\[CrossRef\]](#)
- Costa, P.H.d.O.; Nascimento, S.V.d.; Herrera, H.; Gastauer, M.; Ramos, S.J.; Caldeira, C.F.; Oliveira, G.; Valadares, R.B.d.S. Non-Specific Interactions of Rhizospheric Microbial Communities Support the Establishment of *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* in an Amazon Rehabilitating Mineland. *Processes* **2021**, *9*, 2079. [\[CrossRef\]](#)
- Gastauer, M.; de Medeiros Sarmento, P.S.; Santos, V.C.A.; Caldeira, C.F.; Ramos, S.J.; Teodoro, G.S.; Siqueira, J.O. Vegetative functional traits guide plant species selection for initial mineland rehabilitation. *Ecol. Eng.* **2020**, *148*, 105763. [\[CrossRef\]](#)
- Queiroz, L.P.d. *Leguminosas da Caatinga*; Universidad Estadual de Feira de Santana: Feira de Santana, Brazil, 2009.
- Ramos, S.J.; Caldeira, C.F.; Gastauer, M.; Costa, D.L.P.; Neto, A.E.F.; de Souza, F.B.M.; Souza-Filho, P.W.M.; Siqueira, J.O. Native leguminous plants for mineland revegetation in the eastern Amazon: Seed characteristics and germination. *New For.* **2019**, *50*, 859–872. [\[CrossRef\]](#)
- Giannini, T.C.; Giulietti, A.M.; Harley, R.M.; Viana, P.L.; Jaffe, R.; Alves, R.; Pinto, C.E.; Mota, N.F.; Caldeira, C.F., Jr.; Imperatriz-Fonseca, V.L. Selecting plant species for practical restoration of degraded lands using a multiple-trait approach. *Austral Ecol.* **2017**, *42*, 510–521. [\[CrossRef\]](#)
- Aggangan, N.S.; Anarna, J.A.; Cadiz, N.M. Tree legume–microbial symbiosis and other soil amendments as rehabilitation strategies in mine tailings in the Philippines. *Philipp. J. Sci.* **2019**, *148*, 481–491.
- Jasper, D.A. Beneficial soil microorganisms of the jarrah forest and their recovery in bauxite mine restoration in Southwestern Australia. *Restor. Ecol.* **2007**, *15*, S74–S84. [\[CrossRef\]](#)
- de Oliveira-Longatti, S.M.; Marra, L.M.; Lima Soares, B.; Bomfeti, C.A.; Da Silva, K.; Avelar Ferreira, P.A.; de Souza Moreira, F.M. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 1239–1250. [\[CrossRef\]](#)
- Oliveira Silva, A.; Azarias Guimarães, A.; da Costa, A.M.; Louzada Rodrigues, T.; de Soares Carvalho, T.; Reis Sales, F.; de Souza Moreira, F.M. Plant growth-promoting rhizobacterial communities from an area under the influence of iron mining and from the adjacent phytophysognomies which have high genetic diversity. *Land Degrad. Dev.* **2020**, *31*, 2237–2254. [\[CrossRef\]](#)
- Herrera, H.; Fuentes, A.; Ortiz, J.; Soto, J.; da Silva Valadares, R.B.; Salas-Eljatib, C.; Arriagada, C. Root-associated endophytes isolated from juvenile *Ulex europaeus* L. (Fabaceae) plants colonizing rural areas in South-Central Chile. *Plant Soil* **2022**, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
- Lugtenberg, B.J.; Malfanova, N.; Kamilova, F.; Berg, G. Plant growth promotion by microbes. *Mol. Microb. Ecol. Rhizosphere* **2013**, *2*, 561–573.
- Xie, H.; Yang, D.-H.; Yao, H.; Bai, G.; Zhang, Y.-H.; Xiao, B.-G. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals proteomic changes in leaves of cultivated tobacco (*Nicotiana tabacum*) in response to drought stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *469*, 768–775. [\[CrossRef\]](#)
- Ahmad, P.; Jaleel, C.A.; Salem, M.A.; Nabi, G.; Sharma, S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, *30*, 161–175. [\[CrossRef\]](#)
- Li, R.; Wang, J.; Li, S.; Zhang, L.; Qi, C.; Weeda, S.; Zhao, B.; Ren, S.; Guo, Y.-D. Plasma membrane intrinsic proteins SIPIP2; 1, SIPIP2; 7 and SIPIP2; 5 conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31814. [\[CrossRef\]](#)
- Caldeira, C.F.; Jeanguenin, L.; Chaumont, F.; Tardieu, F. Circadian rhythms of hydraulic conductance and growth are enhanced by drought and improve plant performance. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5365. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Paudel, I.; Gerbi, H.; Zisovich, A.; Sapir, G.; Ben-Dor, S.; Brumfeld, V.; Klein, T. Drought tolerance mechanisms and aquaporin expression of wild vs. cultivated pear tree species in the field. *Environ. Exp. Bot.* **2019**, *167*, 103832. [\[CrossRef\]](#)
- González-Villagra, J.; Kurepin, L.V.; Reyes-Díaz, M.M. Evaluating the involvement and interaction of abscisic acid and miRNA156 in the induction of anthocyanin biosynthesis in drought-stressed plants. *Planta* **2017**, *246*, 299–312. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

25. Baek, D.; Kim, M.C.; Kumar, D.; Park, B.; Cheong, M.S.; Choi, W.; Park, H.C.; Chun, H.J.; Park, H.J.; Lee, S.Y. AtPR5K2, a PR5-like receptor kinase, modulates plant responses to drought stress by phosphorylating protein phosphatase 2Cs. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Wang, F.; Wang, M.; Guo, C.; Wang, N.; Li, X.; Chen, H.; Dong, Y.; Chen, X.; Wang, Z.; Li, H. Cloning and characterization of a novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda corniculata*. *Genet. Mol. Res.* **2016**, *15*, gmr.1502784. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Golestan Hashemi, F.S.; Ismail, M.R.; Rafii, M.Y.; Aslani, F.; Miah, G.; Muharam, F.M. Critical multifunctional role of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in plants. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2018**, *32*, 815–829. [\[CrossRef\]](#)
28. Yang, C.; Zhou, Y.; Fan, J.; Fu, Y.; Shen, L.; Yao, Y.; Li, R.; Fu, S.; Duan, R.; Hu, X. SpBADH of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* strongly confers drought tolerance through ROS scavenging in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **2015**, *96*, 377–387. [\[CrossRef\]](#)
29. Zhang, L.; Gao, M.; Hu, J.; Zhang, X.; Wang, K.; Ashraf, M. Modulation role of abscisic acid (ABA) on growth, water relations and glycinebetaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 3189–3202. [\[CrossRef\]](#)
30. Satish, L.; Rency, A.S.; Ramesh, M. Spermidine sprays alleviate the water deficit-induced oxidative stress in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.) plants. *3 Biotech* **2018**, *8*, 63. [\[CrossRef\]](#)
31. Bai, L.; Zhang, G.; Zhou, Y.; Zhang, Z.; Wang, W.; Du, Y.; Wu, Z.; Song, C.P. Plasma membrane-associated proline-rich extensin-like receptor kinase 4, a novel regulator of Ca^{2+} signalling, is required for abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2009**, *60*, 314–327. [\[CrossRef\]](#)
32. Tiwari, S.; Lata, C. Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: An overview. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Jalmi, S.K.; Bhagat, P.K.; Verma, D.; Noryang, S.; Tayyeba, S.; Singh, K.; Sharma, D.; Sinha, A.K. Traversing the links between heavy metal stress and plant signaling. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Zhao, D.; Li, T.; Wang, J.; Zhao, Z. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: Evidence from RNA-seq data. *Microbiol. Res.* **2015**, *170*, 27–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Erbasol, I.; Bozdog, G.O.; Koc, A.; Pedas, P.; Karakaya, H.C. Characterization of two genes encoding metal tolerance proteins from *Beta vulgaris* subspecies maritima that confers manganese tolerance in yeast. *Biometals* **2013**, *26*, 795–804. [\[CrossRef\]](#)
36. Vatansever, R.; Filiz, E.; Eroglu, S. Genome-wide exploration of metal tolerance protein (MTP) genes in common wheat (*Triticum aestivum*): Insights into metal homeostasis and biofortification. *Biometals* **2017**, *30*, 217–235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Jiang, C.; Bi, Y.; Zhang, R.; Feng, S. Expression of RCHSP70, heat shock protein 70 gene from Chinese rose, enhances host resistance to abiotic stresses. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2445. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Kottmann, L.; Wilde, P.; Schittenhelm, S. How do timing, duration, and intensity of drought stress affect the agronomic performance of winter rye? *Eur. J. Agron.* **2016**, *75*, 25–32. [\[CrossRef\]](#)
39. Shevyakova, N.; Eshinimaeva, B.T.; Kuznetsov, V.V. Expression of ferritin gene in *Mesembryanthemum crystallinum* plants under different supply with iron and different intensity of oxidative stress. *Russ. J. Plant Physiol.* **2011**, *58*, 768–775. [\[CrossRef\]](#)
40. Stein, R.J.; Ricachenevsky, F.K.; Fett, J.P. Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2). *Plant Sci.* **2009**, *177*, 563–569. [\[CrossRef\]](#)
41. Fink, J.R.; Inda, A.V.; Tiecher, T.; Barrón, V. Iron oxides and organic matter on soil phosphorus availability. *Cienc. Agrotecnol.* **2016**, *40*, 369–379. [\[CrossRef\]](#)
42. Wang, F.; Ding, D.; Li, J.; He, L.; Xu, X.; Zhao, Y.; Yan, B.; Li, Z.; Xu, J. Characterisation of genes involved in galactolipids and sulfolipids metabolism in maize and *Arabidopsis* and their differential responses to phosphate deficiency. *Funct. Plant Biol.* **2020**, *47*, 279–292. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Lin, D.L.; Yao, H.Y.; Jia, L.H.; Tan, J.F.; Xu, Z.H.; Zheng, W.M.; Xue, H.W. Phospholipase D-derived phosphatidic acid promotes root hair development under phosphorus deficiency by suppressing vacuolar degradation of PIN-FORMED2. *New Phytol.* **2020**, *226*, 142. [\[CrossRef\]](#)
44. Tran, H.T.; Hurley, B.A.; Plaxton, W.C. Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Sci.* **2010**, *179*, 14–27. [\[CrossRef\]](#)
45. Shimojima, M.; Watanabe, T.; Madoka, Y.; Koizumi, R.; Yamamoto, M.P.; Masuda, K.; Yamada, K.; Masuda, S.; Ohta, H. Differential regulation of two types of monogalactosyldiacylglycerol synthase in membrane lipid remodeling under phosphate-limited conditions in sesame plants. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 469. [\[CrossRef\]](#)
46. Shimojima, M.; Madoka, Y.; Fujiwara, R.; Murakawa, M.; Yoshitake, Y.; Ikeda, K.; Koizumi, R.; Endo, K.; Ozaki, K.; Ohta, H. An engineered lipid remodeling system using a galactolipid synthase promoter during phosphate starvation enhances oil accumulation in plants. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 664. [\[CrossRef\]](#)
47. Alexova, R.; Millar, A.H. Proteomics of phosphate use and deprivation in plants. *Proteomics* **2013**, *13*, 609–623. [\[CrossRef\]](#)
48. Chevalier, F.; Rossignol, M. Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with contrasted root architecture in response to phosphate deficiency. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168*, 1885–1890. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Muneer, S.; Jeong, B.R. Proteomic analysis provides new insights in phosphorus homeostasis subjected to pi (inorganic phosphate) starvation in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Zhou, J.; Jiao, F.; Wu, Z.; Li, Y.; Wang, X.; He, X.; Zhong, W.; Wu, P. OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiol.* **2008**, *146*, 1673–1686. [\[CrossRef\]](#)

51. Aleksza, D.; Horváth, G.V.; Sándor, G.; Szabados, L. Proline accumulation is regulated by transcription factors associated with phosphate starvation. *Plant Physiol.* **2017**, *175*, 555–567. [\[CrossRef\]](#)
52. Sakamoto, K.; Ogiwara, N.; Kaji, T.; Sugimoto, Y.; Ueno, M.; Sonoda, M.; Matsui, A.; Ishida, J.; Tanaka, M.; Totoki, Y. Transcriptome analysis of soybean (*Glycine max*) root genes differentially expressed in rhizobial, arbuscular mycorrhizal, and dual symbiosis. *J. Plant Res.* **2019**, *132*, 541–568. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Vadassery, J.; Tripathi, S.; Prasad, R.; Varma, A.; Oelmüller, R. Monodehydroascorbate reductase 2 and dehydroascorbate reductase 5 are crucial for a mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* **2009**, *166*, 1263–1274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Luo, S.; Yin, J.; Peng, Y.; Xie, J.; Wu, H.; He, D.; Li, X.; Cheng, G. Glutathione is Involved in Detoxification of Peroxide and Root Nodule Symbiosis of *Mesorhizobium huakuii*. *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
55. Nunes, J.A.; Schaefer, C.E.; Ferreira Júnior, W.G.; Neri, A.V.; Correa, G.R.; Enright, N.J. Soil-vegetation relationships on a banded ironstone ‘island’, Carajás Plateau, Brazilian Eastern Amazonia. *An. Acad. Bras. Ciências* **2015**, *87*, 2097–2110. [\[CrossRef\]](#)
56. Thavamani, P.; Samkumar, R.A.; Satheesh, V.; Subashchandrabose, S.R.; Ramadass, K.; Naidu, R.; Venkateswarlu, K.; Megharaj, M. Microbes from mined sites: Harnessing their potential for reclamation of derelict mine sites. *Environ. Pollut.* **2017**, *230*, 495–505. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Fuentes, A.; Herrera, H.; Charles, T.C.; Arriagada, C. Fungal and Bacterial Microbiome Associated with the Rhizosphere of Native Plants from the Atacama Desert. *Microorganisms* **2020**, *8*, 209. [\[CrossRef\]](#)
58. Herrera, H.; Novotná, A.; Ortiz, J.; Soto, J.; Arriagada, C. Isolation and identification of plant growth-promoting bacteria from rhizomes of *Arachnitis uniflora*, a fully mycoheterotrophic plant in southern Chile. *Appl. Soil Ecol.* **2020**, *149*, 103512. [\[CrossRef\]](#)
59. Fowler, W.M.; Fontaine, J.B.; Enright, N.J.; Veber, W.P. Evaluating restoration potential of transferred topsoil. *Appl. Veg. Sci.* **2015**, *18*, 379–390. [\[CrossRef\]](#)
60. Silva, J.R.; Gastauer, M.; Ramos, S.J.; Mitre, S.K.; Neto, A.E.F.; Siqueira, J.O.; Caldeira, C.F. Initial growth of Fabaceae species: Combined effects of topsoil and fertilizer application for mineland revegetation. *Flora* **2018**, *246*, 109–117. [\[CrossRef\]](#)
61. Dastogeer, K.M.; Li, H.; Sivasithamparam, K.; Wylie, S.J. In vitro salt and thermal tolerance of fungal endophytes of *Nicotiana* spp. growing in arid regions of north-western Australia. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2018**, *51*, 602–616. [\[CrossRef\]](#)
62. Dardanelli, M.S.; González, P.S.; Medeot, D.B.; Paulucci, N.S.; Bueno, M.A.; Garcia, M.B. Effects of peanut rhizobia on the growth and symbiotic performance of *Arachis hypogaea* under abiotic stress. *Symbiosis* **2009**, *47*, 175–180. [\[CrossRef\]](#)
63. Zhan, F.; Li, B.; Jiang, M.; Li, T.; He, Y.; Li, Y.; Wang, Y. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and heavy metal accumulation of bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] grown in a lead–zinc mine wasteland. *Int. J. Phytoremediat.* **2019**, *21*, 849–856. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Trindade, F.C.; Ramos, S.J.; Gastauer, M.; Saraiva, A.M.M.; Caldeira, C.F.; Oliveira, G.; da Silva Valadares, R.B. Metaproteomes reveal increased capacity for stress tolerance of soil microbes in ferruginous tropical rocky outcrops. *Pedobiologia* **2020**, *81*, 150664. [\[CrossRef\]](#)
65. Viana, P.L.; Mota, N.F.d.O.; Gil, A.d.S.B.; Salino, A.; Zappi, D.C.; Harley, R.M.; Ilkiu-Borges, A.L.; Secco, R.d.S.; Almeida, T.E.; Watanabe, M.T.C. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: História, área de estudos e metodologia. *Rodriguésia* **2016**, *67*, 1107–1124. [\[CrossRef\]](#)
66. Kirk, P.L. Kjeldahl method for total nitrogen. *Anal. Chem.* **1950**, *22*, 354–358. [\[CrossRef\]](#)
67. Kettler, T.; Doran, J.W.; Gilbert, T. Simplified method for soil particle-size determination to accompany soil-quality analyses. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2001**, *65*, 849–852. [\[CrossRef\]](#)
68. do Nascimento, S.V.; Magalhaes, M.M.; Cunha, R.L.; de Oliveira Costa, P.H.; de Oliveira Alves, R.C.; de Oliveira, G.C.; da Silva Valadares, R.B. Differential accumulation of proteins in oil palms affected by fatal yellowing disease. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195538. [\[CrossRef\]](#)
69. Herrera, H.; Valadares, R.; Oliveira, G.; Fuentes, A.; Almonacid, L.; do Nascimento, S.V.; Bashan, Y.; Arriagada, C. Adaptation and tolerance mechanisms developed by mycorrhizal *Bipinnula fimbriata* plantlets (Orchidaceae) in a heavy metal-polluted ecosystem. *Mycorrhiza* **2018**, *28*, 651–663. [\[CrossRef\]](#)
70. Mao, X.; Cai, T.; Olyarchuk, J.G.; Wei, L. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3787–3793. [\[CrossRef\]](#)
71. Oliveira, R.R.; Silva, R.L.; Nunes, G.L.; Oliveira, G. PIMBA: A Pipeline for MetaBarcoding Analysis. *bioRxiv* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
72. Zhang, J.; Kobert, K.; Flouri, T.; Stamatakis, A. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 614–620. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Abarenkov, K.; Henrik Nilsson, R.; Larsson, K.H.; Alexander, I.J.; Eberhardt, U.; Erland, S.; Høiland, K.; Kjoller, R.; Larsson, E.; Pennanen, T. The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. *New Phytol.* **2010**, *186*, 281–285. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Cole, J.R.; Wang, Q.; Fish, J.A.; Chai, B.; McGarrell, D.M.; Sun, Y.; Brown, C.T.; Porras-Alfaro, A.; Kuske, C.R.; Tiedje, J.M. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D633–D642. [\[CrossRef\]](#)

-
75. Nguyen, N.H.; Song, Z.; Bates, S.T.; Branco, S.; Tedersoo, L.; Menke, J.; Schilling, J.S.; Kennedy, P.G. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* **2016**, *20*, 241–248. [[CrossRef](#)]
 76. Louca, S.; Parfrey, L.W.; Doebeli, M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* **2016**, *353*, 1272–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]