

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética

Adauto Gomes Barbosa Neto

**Análise proteômica de Lemnaceae associada à produção
de biomassa e bioenergia**

Recife
2017

Adauto Gomes Barbosa Neto

**Análise proteômica de Lemnaceae associada à produção
de biomassa e bioenergia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Área de Concentração Biologia Molecular, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Recife

2017

Catálogo na fonte
Rafaela Mello
CRB 2122

Barbosa Neto, Aduino Gomes
Análise proteômica de Lemnaceae associada à produção de biomassa e bioenergia/ Aduino Gomes Barbosa Neto - Recife: O Autor, 2017.

153 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Tercilio Calsa Junior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Genética, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Fitorremediação 2. Genética 3. Lentilhas-d'água 4. Lemnaceae I. Tercilio Calsa Junior (orientador) II. Título

584.64

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-238

Adauto Gomes Barbosa Neto

**Análise proteômica de Lemnaceae associada à produção
de biomassa e bioenergia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Área de Concentração Biologia Molecular, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Aprovado em 17/02/2017

Comissão Examinadora:

Dr. Tercilio Calsa Junior/Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal/Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Katia Castanho Scortecci/Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dr. Emmanuel Damilano Dutra/Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Valesca Pandolfi/Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, Maria e Jozeildo, que, em todos os momentos, me incentivaram e se doaram fazendo dos meus sonhos os próprios sonhos. À minha esposa, Paula Karina, pela compreensão, dedicação e por partilhar de magníficos momentos, comemorando ou consolando, e ao nosso filhote (Walle) pelo companheirismo nas madrugadas. Aos amigos e amigas, representados por Marciana Morais, com quem divido honrosa e alegremente esta conquista.

DEDICO

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus criador de todas as coisas.

Agradeço,

À minha família, pelo amor, dedicação e por ensinar o maior valor da vida.

Ao professor Dr. Tercilio Calsa Junior, pela confiança, pelos desafios e pelo respeito e serenidade em momentos conturbados.

À família LGPP/UFPE, que contribuíram com o trabalho, seja auxiliando em bancada, seja me fortalecendo e me revigorando para voltar à bancada.

Às professoras Lilia, Terezinha e Cláudia e aos amigos e amigas do LCTV, pela receptividade e disposição em contribuir com o desenvolvimento desta tese.

À Luciana e Andréa Cantarelli, ao seu pai Otacílio Cantarelli (*in memoriam*), Lígia Martinelli e todos que fazem a Lógica Ambiental, pelas valiosas contribuições e formação pessoal.

Ao professor Vladimir Costa, pelo exemplo e pela boa vontade em ensinar, que nos deu confiança e autonomia em espectrometria de massas.

À Julia Campos, pela confiança e amizade; e, ao CETENE pelo acesso e pela disponibilidade da estrutura e do MALDI-ToF/ToF.

Ao professor Eric Lam, *Rutgers University – New Jersey*, pela discussão e contribuição científica.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética da UFPE, pela oportunidade de desenvolver e acolher este projeto de pesquisa.

Ao programa DS/CAPES, pela ampliação de concessão de bolsas, possibilitando o ingresso de estudantes pobres em cursos *stricto-senso*, contribuindo para desenvolvimento científico e tecnológico do país.

À CGU, por incrementar a tensão de um inocente em fim de doutorado e fazer acreditar que o Brasil um dia poderá ser livre de corrupção. #FORATEMER

Às agências de fomento (FACEPE, CNPq e FAPESP) e ao INCT Bioetanol por possibilitar o desenvolvimento da pesquisa.

Ao CBAB, na pessoa da professora Ana Carolina Maisonnave Arisi e toda sua equipe na UFSC e aos participantes do curso 01/2016 (Mailen, Florência, Álvaro, Danilo, Luiza, Ana Carolina e Kamila) por promover ambiente de intercâmbio científico e cultural, uma das melhores experiências acadêmica e pessoal.

Às professoras Dra. Ana Christina (UFPE) e Dra. Katia Scortecci (UFRN), à Dra. Valesca Pandolfi (UFPE), e ao professor Dr. Emmanuel Dutra (UFPE), por aceitar prontamente o convite para participação na banca examinadora e pelas importantes contribuições dadas. E ainda, aos suplentes, professor Dr. Marcos André (UFPE) e ao Dr. João Pacífico (UFPE).

“What we know is a drop, what we don't know is an ocean.”

Isaac Newton

Resumo

Lentilhas-d'água ou *duckweed*, em inglês, são pequenas macrófitas aquáticas, consideradas como as menores angiospermas conhecidas, agrupadas na família Lemnaceae. Estas plantas apresentam capacidade natural de se adaptar e colonizar água residual antropogênica, reciclando diversos poluentes e gerando elevada quantidade de biomassa, o que têm despertado interesse para tratamento de efluentes e para produção de bioenergia. Estudos moleculares têm sido aplicados em lentilhas-d'água de maneira crescente visando seu desenvolvimento genético e biotecnológico como planta cultivada. Neste contexto, o presente projeto caracterizou clones de lentilhas-d'água coletados na região metropolitana de Recife-PE, nordeste do Brasil, quanto ao seu potencial para fitorremediação e produção de biomassa para bioenergia e, ainda, detectou proteínas diferenciais associadas ao potencial biotecnológico de lentilha-d'água cultivada na presença de água residual. A caracterização *in vitro* revelou elevado potencial plástico dos clones de lentilhas-d'água, em contraste, revelou baixa diversidade genética revelada pela análise fenética da sequência intergênica cloroplastidial *atpF-atpH*. O estudo também revelou que o meio Schenk&Hildebrandt (SH), 1/2 força, melhora o crescimento dos clones, aumentando significativamente a produção de biomassa. Cultivados em água residual, quatro clones, foram capazes de remover significativa quantidade de nitrogênio e fósforo. Enquanto a análise proteômica revelou 213 proteínas diferenciais, potencialmente associadas com a adaptação e o sucesso de lentilhas-d'água para crescer a partir águas residuais, revelando os potenciais mecanismos moleculares, metabólicos e fisiológicos, que poderá contribuir para identificação de marcadores funcionais para aplicações biotecnológicas das lentilhas-d'água.

Palavras-chave: Lentilhas-d'água. Proteoma. Genética. Plasticidade. Fitorremediação.

Abstract

Duckweed are small aquatic macrophytes, considered as the smallest known angiosperms, grouped in the family Lemnaceae. These plants have the natural ability to adapt and colonize anthropogenic wastewater, recycling several pollutants and generating a high amount of biomass, which has aroused interest in effluent treatment and bioenergy production. Molecular studies have been applied in duckweed growing to increase genetic and biotechnological development as a crop plant. In this context, the present project characterized duckweed clones from metropolitan region of Recife-PE, northeast of Brazil, regarding their potential for phytoremediation and biomass production for bioenergy, and also detected differential proteins associated with biotechnological potential of duckweed cultivated from wastewater. *In vitro* characterization revealed a high plastic potential of the duckweed clones, in contrast, with the low genetic diversity revealed by the phenetic analysis from *atpF-atpH* intergenic spacer chloroplastic sequences. The study also revealed that the Schenk and Hildebrandt (SH) medium, half strength, improves the growth of clones, increasing biomass production significantly. Cultivated in wastewater, four clones, were able to remove significant amounts of nitrogen and phosphorus. While the proteomic analysis revealed 213 differential proteins, potentially associated with the adaptation and success of duckweed to grow from wastewater. These results revealed the potential molecular, metabolic and physiological mechanisms that could contribute to the identification of functional markers for duckweed biotechnological applications.

Keywords: Duckweed. Proteome. Genetics. Plasticity. Phytoremediation.

Lista de Ilustrações

Revisão da Literatura

Figura 1 – Tamanho das frondes típicas dos gêneros da família Lemnaceae.	17
Figura 2 – Representação do ciclo de vida das lentilhas-d'água e estruturas reprodutivas.	19
Figura 3 – Representação da variação do tamanho do genoma de 23 espécies de Lemnaceae agrupadas por gênero, a partir de 112 clones.	20
Figura 4 – Representação simplificada de regulação da transição juvenil-adulto em lentilhas-d'água, proposta a partir do modelo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Figura 5 – Cenário brasileiro de tratamento de esgoto no ano de 2014	30

Capítulo I

Figura 1. Árvore consenso de análise fenética <i>Neighbor-joining</i> para distância genética dos clones de <i>Lemna aequinoctialis</i> isolados na região metropolitana de Recife, Pernambuco, Brasil, a partir de sequência intergênica <i>atpF-atpH</i> , exibindo os valores de bootstrap (1.000 replicatas), baseado em modelo <i>p-distance</i>	51
Figura 2. Gráfico da ACP dos clones de <i>Lemna aequinoctialis</i> (M1, M2, U1, U2, PA, AL, RC, DI e CA) cultivados in vitro em meio SH 1X e meio SH 0,5X..	52

Capítulo II

Figura 1. Monitoramento do crescimento, do teor de amido e da produção de biomassa de <i>Lemna aequinoctialis</i> clone M1 cultivada em SH (controle), em SH:SW e em SW durante 21 dias.....	85
Figura suplementar S1. Aspecto das frondes de <i>Lemna aequinoctialis</i> clone M1 após 21 dias de cultivo em meio SH (A e D), SH:SW (B e E) e SW (C e F).	86
Figura 2. Monitoramento do teor de pigmentos fotossintéticos e de carotenoides de <i>Lemna aequinoctialis</i> clone M1 cultivada em SH (A), em SH:SW (B) e em SW (C) durante 21 dias.	92
Figura 3. Teor de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) do	

metabolismo antioxidante em *Lemna aequinoctialis* clone M1 cultivada em SH (A), em SH:SW (B) e em SW (C) durante 21 dias..... 94

Figura 4. Mapas proteômicos 2-DE (eletroforese bidimensional), distribuição e variação de acúmulo das proteínas identificadas em *Lemna aequinoctialis* clone M1.. 96

Figura 5. Categorização dos termos de ontologia gênica para proteínas diferencialmente acumuladas em *Lemna aequinoctialis* clone M1 crescida em meio SH:SW, usando SH como referência. 98

Figura 6. Plantas de *Lemna aequinoctialis* clone M1 cultivadas durante seis dias (A, B e C) e plantas cultivadas por 15 dias (D). 103

Discussão Geral

Figura 1 – Localização e registros dos pontos de coleta de lentilhas-d’água na região metropolitana de Recife, Pernambuco, Brasil..... 115

Figura 2 – Representação de modelo celular do proteoma diferencial de *Lemna aequinoctialis* clone M1 crescendo a partir de meio contendo água de esgoto (SH:SW), usando SH como referência..... 118

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Descrição dos locais de coleta de lentilhas-d'água na região metropolitana de Recife, Pernambuco, Brasil.	43
Tabela 2. Parâmetros de crescimento, produção de biomassa e teor de amido de clones de <i>Lemna aequinoctialis</i> cultivadas in vitro em meio SH 1X e 0,5X.	54
Tabela 3. Teor de clorofila a, b e total e carotenoides dos clones de <i>Lemna aequinoctialis</i> quando cultivadas em meio SH 0,5X ou 1X.	57
Tabela 4. Atividade específica de enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), do sistema antioxidante em plantas; nos clones de <i>Lemna aequinoctialis</i> cultivadas em meio SH 1X ou 0,5X.	58
Tabela 5. Caracterização do efluente da estação de tratamento de esgoto da Mangueira (Recife, Brasil) antes e após 19 dias de cultivo de clones de <i>Lemna aequinoctialis</i> e apresentação do rendimento em biomassa (RB).	63

Capítulo II

Tabela 1. Equações ajustadas por análise de regressão e seus respectivos coeficientes de determinação (R ²) e de variância (C.V.%) para TCR, Amido e RB de <i>L. aequinoctialis</i> clone M1 em 1, 3, 6, 10, 15 e 21 dias de cultivo em função do meio de cultivo.	89
Tabela 2. Rendimento teórico em bioetanol (L.ha ⁻¹) a partir da biomassa <i>Lemna aequinoctialis</i> clone M1 acumulada após 15 e 21 dias de cultivo em meio SH, SH:SW e SW.	89
Tabela 3. Identificação de proteínas de <i>Lemna aequinoctialis</i> clone M1 induzidas para crescimento em meio SH:SW, usando SH como referência.	99
Tabela 4. Identificação de proteínas de <i>Lemna aequinoctialis</i> clone M1 inibidas para crescimento em meio SH:SW, usando SH como referência.	100

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ETE	Estação de tratamento de esgoto
VNTR	Repetições em tandem de número variável, do inglês, <i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
miRNA/miR	Micro-RNA
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
BLAST	Ferramenta de busca básica de alinhamento local, do inglês, <i>Basic local alignment search tool</i>
Mpb	Mega pares de base
T-DNA	DNA de transferência
IEF	Focalização isoeétrica, do inglês, <i>Isoelectric focusing</i>
2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
MS	Espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, do inglês, <i>Liquid chromatography mass spectrometry</i>
MS	Meio de cultivo Murashige&Skoog (1962)
SH	Meio de cultivo Schenk&Hildebrandt (1972).
1X	Força iônica completa de meio de cultivo
0,5X	Meia-força iônica de meio de cultivo
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, do inglês, <i>Up flow Anaerobic Sludge Blanket reactor</i>
TCR	Taxa de crescimento relativo
TD	Tempo de duplicação
RB	Rendimento em biomassa
Clor	Clorofila
Car	Carotenoides
RTEtOH	Rendimento teórico em etanol
SOD	Superóxido dismutase
APX	Ascorbato peroxidase

CAT	Catalase
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>
EC	Código de enzima, do inglês, <i>Enzyme code</i>
ACP	Análise de componentes principais
CP	Componentes principais
DQO	Demanda química de oxigênio
NT	Nitrogênio total
NH ₄ -N	Nitrogênio amoniacal
PT	Fósforo total
SMEWW	Métodos padronizados para análise de água e águas efluentes, do inglês, <i>Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater</i>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida unidimensional
MALDI	Ionização por dessorção à laser assistida por matriz, do inglês, <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
ToF	Tempo de vôo, do inglês, <i>Time-of-flight</i>
DAP	Proteína diferencialmente acumulada, do inglês, <i>Differentially accumulated protein</i>
GO	Ontologia gênica, do inglês, <i>Gene ontology</i>
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 LENTILHAS-D'ÁGUA: UM MODELO PARA BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA VEGETAL	17
2.2 ASPECTOS GENÉTICOS DE LENTILHAS-D'ÁGUA ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE BIOMASSA E FITORREMEDIAÇÃO	19
2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LENTILHAS-D'ÁGUA	26
2.3.1 Produção de biomassa para bioenergia.....	27
2.3.2 Fitorremediação e tratamento de águas residuais	29
2.3.3 Engenharia genética e bioprodução	31
2.4 PROTEÔMICA DE PLANTAS	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 CAPITULO I	37
Diversidade biológica de clones de <i>Lemna aequinoctialis</i> (L.) influencia a produção de biomassa e fitorremediação de efluente	38
5 CAPITULO II	72
Proteômica diferencial associada ao crescimento de <i>Lemna aequinoctialis</i> L. cultivada em presença de efluente sanitário	73
6 DISCUSSÃO GERAL	115
7 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS	122
APÊNDICE A – TABELA DE ANOTAÇÃO DE TERMOS GO (GENE ONTOLOGY) E EC (ENZYME CODE) DE PROTEÍNAS DIFERENCIAIS PARA COMPARAÇÃO SW VS. SH	129
APÊNDICE B – TABELA DE ANOTAÇÃO DE TERMOS GO (GENE ONTOLOGY) E EC (ENZYME CODE) DE PROTEÍNAS DIFERENCIAIS PARA COMPARAÇÃO SW VS. SH:SW	138
ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL VEGETAL	147
CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO	148

1 INTRODUÇÃO

A água é o principal recurso natural para manutenção da vida, sendo este recurso a base necessária para o estabelecimento e manutenção dos diversos ecossistemas existentes. Portanto, a escassez de recursos hídricos, naturalmente, provoca impactos irreparáveis à biosfera. Encorajando investimentos massivos para aumentar a eficiência do uso e reuso de água e sua conservação, a fim de garantir a produção de alimentos e as atividades humanas, além de minimizar os danos ambientais.

Dentre os sistemas biotecnológicos para conservação de água, a fitorremediação tem sido descrita como eficiente no sequestro e transformação de poluentes orgânicos emergentes. Neste contexto, as lentilhas-d'água, pequenas plantas aquáticas flutuantes, são apontadas como eficiente agente remediador poluentes de relevância mundial, com a característica de agregar valor a estes sistemas a partir da geração de biomassa com relevante potencial biotecnológico.

Lentilhas-d'água ou *duckweeds*, no inglês, são plantas aquáticas da família *Lemnaceae*, descritas como as menores angiospermas do mundo. Estas plantas apresentam rápida taxa de crescimento e menor tempo de duplicação de biomassa, responsável pela elevada produção de biomassa, sendo capaz de superar a maioria das culturas terrestres para bioenergia.

Além disso, as lentilhas-d'água possuem características naturais relevantes de interesse para a biologia e biotecnologia vegetal, tais como: i) crescimento rápido e clonal; ii) alta adaptabilidade; iii) alto teor natural de proteína; iv) elevado teor de amido, com pouca lignina; v) capacidade natural de se adaptar e colonizar águas residuais antropogênicas, removendo significativas quantidades de contaminantes emergentes.

Contudo, a aplicação potencial de lentilhas-d'água pode ser influenciada pela sua diversidade genética, o que suporta o desenvolvimento de pesquisas para compreensão dos mecanismos moleculares ligados às potenciais aplicações biotecnológicas.

Neste contexto, o presente projeto teve como objetivo coletar, isolar, identificar e caracterizar lentilhas-d'água nativas, a partir da região metropolitana de Recife-PE, Brasil, e avaliar seu potencial biotecnológico para fitorremediação, identificando mecanismos moleculares associados à produção de biomassa para bioenergia a partir de efluente. Para isto, foi realizada a análise do proteoma (conjunto de proteínas expressas pelo genoma) da lentilha-d'água, cultivada em efluente de estação de tratamento de esgoto (ETE).

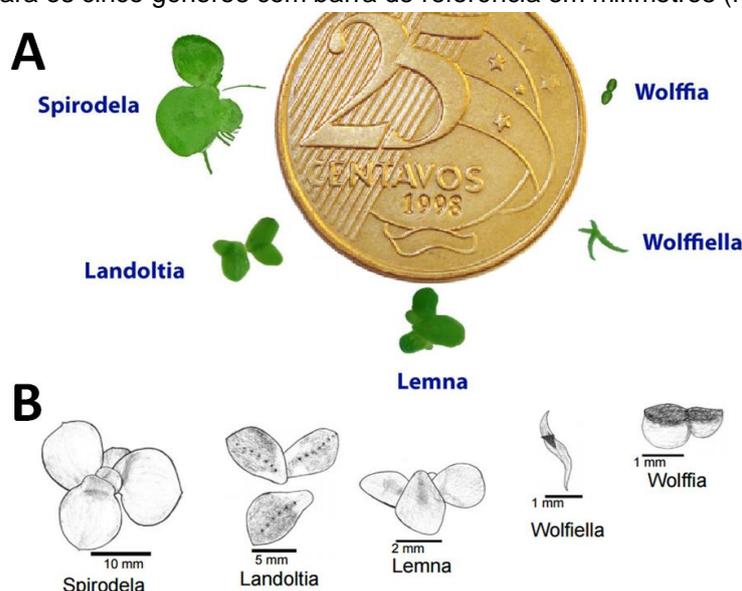
Conseqüentemente, a integração dos dados proteômicos e genômicos disponíveis contribuirá para compreensão da biologia e genética destas plantas com grande potencial biotecnológico, contribuindo com estado da arte de lentilhas-d'água a partir da caracterização de clones nativos e da detecção de proteínas associado ao seu crescimento a partir de água residual de uma estação de tratamento de esgoto doméstico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LENTILHAS-D'ÁGUA: UM MODELO PARA BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA VEGETAL

As lentilhas-d'água ou “*duckweeds*”, do inglês, são macrófitas aquáticas flutuantes, cosmopolitas, que são facilmente encontradas em corpos d'água parada ou de baixo fluxo e em águas residuais. São plantas monocotiledôneas, as menores angiospermas conhecidas (1-15 mm) (Figura 1) pertencentes à família *Lemnaceae* (Landolt, 1986; Appenroth et al., 2013a). As lentilhas-d'água possuem estrutura extremamente simples, denominada fronde, uma estrutura modificada, similar a uma folha (Landolt, 1986).

Figura 1 – Tamanho das frondes típicas dos gêneros da família Lemnaceae. A) Frondes representativas para os cinco gêneros, comparada com moeda de R\$ 0,25 (vinte e cinco centavos), com tamanho próximo da moeda de 25 centavos de real. B) Ilustração de frondes representativas para os cinco gêneros com barra de referência em milímetros (mm).



Fonte: (A) Wang et al. (2011), adaptada; (B) Dr. K. Sowjanya Sree, Amity University Delhi, adaptada.

Atualmente, são descritas 37 espécies de lentilhas-d'água, distribuídas em cinco gêneros monofiléticos: *Spirodela* (duas espécies), mais primitivo; *Lemna* (13 espécies); *Landoltia* (uma espécie); *Wolffiella* (10 espécies); e *Wolffia* (11

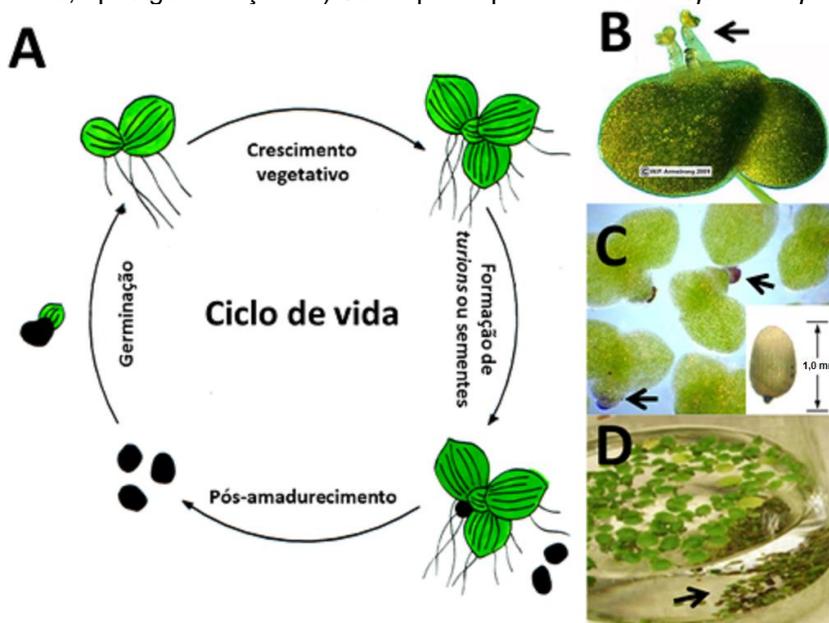
espécies), mais derivado (Landolt, 1986; Les et al, 1997; Landolt, 1998; Les e Crawford, 1999; Les et al., 2002; Bog et al., 2010).

A redução ou simplificação estrutural das lentilhas-d'água parece estar fortemente relacionada aos aspectos evolutivos destas plantas (Wang et al., 2011) e à adaptação altamente especializada ao ambiente aquático (Landolt, 1986; Les et al., 2002). A morfologia das lentilhas-d'água é extremamente suscetível a estímulos ambientais, resultante da eficiente resposta de expressão gênica, o que dificulta a identificação de espécie, às vezes mesmo para gênero, baseada em caracteres morfológicos (Tang et al., 2014).

As lentilhas-d'água possuem ciclo de vida especializado (Figura 2A), que raramente desenvolve flores (Figura 2B) e sementes (Figura 2C) (Landolt, 1986). Contudo, algumas lentilhas-d'água apresentam adaptação às mudanças sazonais, por exemplo, *Spirodela polyrhiza* induz a formação de turiões (*turions*, em inglês), em resposta a diversos sinais ambientais (Appenroth e Nickel, 2010), modulado por pequenos carboidratos (Appenroth et al., 2013b). Os turiões (Figura 2D) são gemas vegetativas dormentes que possuem elevado teor de amido e são cruciais para sobrevivência desta lentilha-d'água durante o congelamento da superfície aquática no inverno das regiões temperadas (Wang e Messing, 2012).

Em condições favoráveis, as lentilhas-d'água se propagam vegetativamente por brotação, onde novas folhas brotam lateralmente a partir da folha mais velha, dando origem a populações geneticamente uniformes, capazes de crescer rapidamente e colonizar a superfície de reservatórios naturais de água. Há, assim, redução da capacidade de outras plantas aquáticas e algas se estabelecerem no mesmo reservatório (Landolt, 1986; Bartley e Spence, 1987), minimizando maiores danos da eutrofização.

Figura 2 – Representação do ciclo de vida das lentilhas-d'água e estruturas reprodutivas. A) Etapas do ciclo de vida de lentilhas-d'água. B) Seta indica inflorescência observada em *Lemna gibba*. C) Semente de *Lemna perpusilla*, vista no canto inferior direito e as setas apontam para sementes anexadas, após germinação. D) Seta aponta para turiões de *Spirodela polyrrhiza*.



Fonte: (A) Appenroth et al. (2013b), adaptada; (B) ©WP Armstrong (2001); (C) W.P. Armstrong (2006/2007); (D) Wang e Messing (2012).

As lentilhas-d'água são utilizadas há mais de cinco décadas em estudos científicos que proporcionaram importantes avanços na biologia vegetal. Contudo, apenas recentemente o seu potencial biotecnológico, como biomassa para produção de bioenergia e aplicação para resolver questões ambientais emergentes, reacendeu o interesse da comunidade científica de plantas (Zhao et al., 2012; Lam et al., 2014). No entanto, o principal desafio é avançar no desenvolvimento de pesquisa básica com lemnáceas, assim como ocorreu para outras plantas modelos e cultivadas, como *Arabidopsis thaliana* e o arroz, *Oryza sativa* (Zhao et al., 2012).

2.2 ASPECTOS GENÉTICOS DE LENTILHAS-D'ÁGUA ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE BIOMASSA E FITORREMEDIAÇÃO

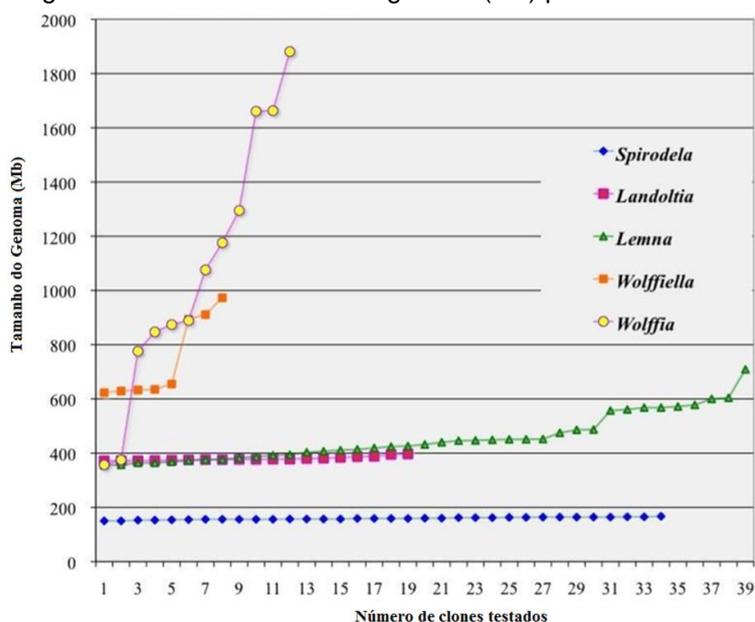
As pesquisas iniciais com lentilhas-d'água, já a partir da década de 1980, as indicavam como um promissor modelo para estudos de fisiologia, bioquímica e

evolução de plantas (Lam et al., 2014). Contudo, assim como ocorreu para outras culturas de interesse biotecnológico, o desenvolvimento de pesquisa e programas de melhoramento de lentilhas-d'água requer a composição de uma base genética robusta (Bergmann et al., 2000).

Assim, já em 2009, o *Joint Genome Institute* (<http://jgi.doe.gov/why-sequence-the-greater-duckweed/>) iniciou o projeto de sequenciamento do genoma de *Spirodela polyrhiza* clone 7498, visto que a publicação do genoma fomentaria o desenvolvimento de novas pesquisas destas plantas (Lam et al., 2014).

Em busca de compreender um pouco mais as relações genéticas e evolutivas das lentilhas-d'água foi realizado um importante estudo que analisou o tamanho do genoma de clones representantes de 23 espécies dos cinco gêneros de Lemnaceae (Wang et al., 2011), representado na Figura 3.

Figura 3 – Representação da variação do tamanho do genoma de 23 espécies de Lemnaceae agrupadas por gênero, a partir de 112 clones. No eixo da abcissa (x) está representado o número acumulado de acessos (clones) testados por gênero: *Spirodela* (34 clones); *Landoltia* (19 clones); *Lemna* (39 clones); *Wolffiella* (8 clones); *Wolffia* (12 clones). O eixo das ordenadas (y) representa o tamanho total dos genomas observados em megabase (Mb) para cada clone testado.



Fonte: Wang e Messing (2015).

Neste estudo, Wang et al. (2011) demonstraram que *S. polyrhiza* possui o menor genoma entre as espécies, apenas cerca de 150 Mpb, enquanto a *Wolffia arrhiza* possui um genoma 13 vezes maior, 1,881 Mpb. Assim, de modo geral, o estudo ainda observou que o tamanho do genoma de lentilhas-d'água tende a ser inversamente proporcional ao tamanho da planta.

Contudo, somente recentemente, os dados genômicos de *S. polyrhiza* foram publicados (Wang et al., 2014a). O sequenciamento completo do genoma de *S. polyrhiza* (158 Mb) revelou dois eventos de duplicação completa há cerca de 95 milhões de anos. A análise de sequências de DNA repetido, revelou que os retrotransposons representam 13,06% do genoma e 1,66% de repetições em tandem de número variável (VNTR), composta em sua maioria por regiões microsatélites (cerca de 50%). Em espécies próximas como *Brachypodium distachyon* (braquipódio, Poaceae), *O. sativa* (arroz, Poaceae), *Sorghum bicolor* (sorgo, Poaceae) e *A. thaliana* (Brassicaceae) esse percentual de microsatélites varia 3% a 6% do genoma referência. Estes dados reforçam o potencial para regulação mais rigorosa da expressão gênica na lentilha-d'água.

Spirodela polyrhiza apresentou redução significativa do número de genes (19.623) quando comparado a *A. thaliana* (27.416) e arroz (39.049), por exemplo. Contudo, *Spirodela* compartilha 8.255 famílias gênicas homólogas a de espécies próximas (Wang et al., 2014a).

A anotação gênica revelou estreita relação da organização e a estrutura do genoma de *Spirodela* com o seu estilo de vida, o que reflete sua adaptação ao ambiente aquático e seu estilo de vida altamente especializado. Por exemplo, o número cópias de genes da biossíntese de lignina é cerca de 50% menor que de plantas cultivadas, como sorgo (141) e arroz (156). Esta observação se estende a

outras famílias gênicas, como de genes da biossíntese de celulose e de genes codificantes para expansinas (Wang et al., 2014a).

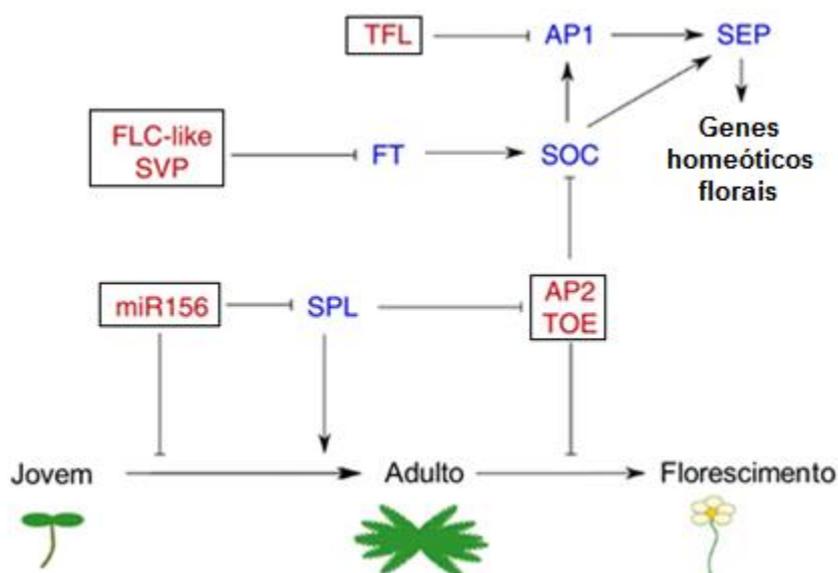
Por outro lado, outras famílias gênicas tiveram o número de cópias aumentado. Caso observado para gene *GOGAT* (*Glutamine oxoglutarate aminotransferase*), que codifica uma glutamato sintase, com 11 cópias em *S. polyrhiza*, três cópias em arroz e duas em *Arabidopsis*. Esta enzima está envolvida na assimilação e metabolismo de nitrogênio e biossíntese de aminoácidos. Este aumento de cópias no genoma das lentilhas-d'água pode garantir provavelmente uma maior eficiência na captação deste nutriente, para manutenção e suporte do rápido crescimento das lentilhas-d'água (Wang et al., 2014a).

Outro exemplo interessante é de famílias gênicas de micro-RNAs (miRs), como miRNA156, miRNA169 e miRNA172, envolvidos na supressão da transição da fase juvenil para fase adulta (Gandikota et al., 2007), na resistência a seca (Zhao et al., 2007) e na transição para fase adulta (Lauter et al., 2005), respectivamente. Em *Spirodela* os genes miRNA156 foram descritos para 24 *loci*, ou 32 quando inclui isoformas de alta similaridade, enquanto que para *Arabidopsis* e arroz foram descritos 10 e 19 *loci*, respectivamente. Os genes miRNA169 e miRNA172 foram reduzidos de nove para um *loci* quando comparado a *Arabidopsis*. A redução de cópias também foi observada para famílias gênicas envolvidas no controle da progressão para fase adulta e para o florescimento, como SBP (*squamosa promoter binding protein*), MADS-box e PEBP (*phosphatidylethanolamin binding protein*) (Wang et al., 2014a).

Estes dados genômicos são coerentes com a redução do tamanho, a compactação morfológica, a adaptação ao ambiente aquático e maior controle da

transição da fase juvenil para fase madura, e menor desenvolvimento de órgãos como raízes, caules e flores. A Figura 4 representa simplificada a via de regulação da fase de transição juvenil-adulto em lentilhas-d'água, a partir do modelo de *Arabidopsis*, onde observa-se que a maioria dos genes reguladores possuem vários parálogos funcionalmente semelhantes, como os genes: *TERMINAL FLOWER 1* (TFL); semelhante ao *FLOWERING LOCUS C* (FLC-like); *APETALA2* (AP2); *TARGET OF EAT* (TOE); e, o miRNA 156 (miR156), capazes de reprimir a expressão de genes envolvidos com diferenciação meristemática e florescimento, como o *APETALA1* (AP1), *CAULIFLOWER* (CAL) e *FRUITFULL* (FUL).

Figura 4 – Representação simplificada de regulação da transição juvenil-adulto em lentilhas-d'água, proposta a partir do modelo de *Arabidopsis thaliana*. Os genes com número de cópias semelhante ou aumentado em *Spirodela* são mostrados dentro de caixa. Os demais genes apresentam número de cópias significativamente reduzido em *Spirodela*. TFL: *Terminal flower 1*; AP1: *apetala 1* (incluindo os genes *cauliflower* e *fruitful*); SEP: *sepallata*; FLC-like: semelhante ao *flowering locus C*; SVP: *short vegetative phase*; FT: *flowering locus T*; SOC: *suppressor of constans overexpression*; SPL: *squamosa promoter binding protein-like*; AP2: *apetala 2*; TOE: *target of eat*.



Fonte: Wang et al. (2014a), adaptada.

Na via da biossíntese de amido, a análise filogenética mostrou alta conservação das famílias gênicas envolvidas nesta via na *Spirodela*, quando comparada com arroz, milho e *Arabidopsis*. Ainda na via da biossíntese de amido foi observado aumento no número de cópias de genes codificantes para subunidade maior da AGPase (ADP-glicose pirofosforilase) e DBE (enzima de desramificação do amido), enzimas chaves na produção e acúmulo de amido (Wang et al., 2014a).

Contudo, em 2008, a sequência completa do genoma cloroplastidial de *Lemna minor*, com anotação de 112 genes, estava disponível (Mardanov et al., 2008). Les et al. (2002), reconheceram previamente que a sequência do genoma cloroplastidial de lentilhas-d'água contribuiriam para identificação de marcadores moleculares adequados a estudos de genotipagem, capazes de suportar análises filogenéticas robustas das lemnáceas, resolvendo a identificação intra e interespecíficas de lentilhas-d'água, prejudicada em seu estudo.

Como previsto, foram avaliados sete marcadores plastidiais, sendo quatro de genes codificantes (*rpoB* – RNA polymerase beta subunit, *rpoC1* – RNA polymerase gamma subunit, *rbcL* – ribulose-1,5-bifosfato carboxylase/oxygenase large subunit e *matK* – maturase K) e três espaçadores intergênicos não-codificantes (*atpF-atpH*, *psbK-psbl* e *trnH-psbA*), para identificação e descrição de 31 espécies dos cinco gêneros da família *Lemnaceae*, baseada em PCR e sequenciamento de DNA (Wang et al., 2010). Os resultados deste estudo indicaram o espaçador intergênico *atpF-atpH* com um bom marcador para identificação de espécies, enquanto que os espaçadores intergênicos *psbK-psbl* e *trnH-psbA* mostraram-se adequados para resolução de genótipos intraespecíficos.

Em estudo recente, abrangendo as 37 espécies descritas de lentilhas-d'água foi demonstrado que os espaçadores intergênicos *atpF-atpH* e *psbK-psbI* foram capazes de resolver a identificação validada de 30 espécies, utilizando simples protocolo baseado em PCR-sequenciamento-BLAST (Borisjuk et al., 2015). Este estudo ainda disponibilizou ferramenta *online* para BLAST em banco específico “Barcode Reference” em <http://epigenome.rutgers.edu/cgi-bin/duckweed/blast.cgi>.

Os esforços para identificação e compreensão das relações filogenéticas das lentilhas-d'água são justificados pela estreita relação entre a diversidade genética e potencial de aplicação biotecnológico das lentilhas-d'água (Xue et al., 2012).

Wang e Messing (2015), a partir da análise do estado da arte de estudos “ômicos” de lentilhas-d'água, observaram que a disponibilização do genoma de *Spirodela* facilita o sequenciamento de outras lentilhas-d'água, servindo como genoma de referência para anotação de novos genomas, e estimula o desenvolvimento de pesquisas moleculares, contribuindo para melhorar a compreensão da biologia e biotecnologia destas plantas e suportando o desenvolvimento de programas de melhoramento genéticos de lentilhas-d'água.

De fato, ainda em 2015, os resultados preliminares do genoma da lentilha-d'água *Lemna minor* foram disponibilizados (Van Hoeck et al., 2015). O genoma de *Lemna minor* clone 5500, amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos, com 481 Mbp, cerca de três vezes o genoma de *Spirodela*, exibiu 22.382 genes codificadores de proteínas e 61,5% de sequências repetitivas, que explica mais de 94% do aumento do tamanho do genoma, comparado ao de *Spirodela*. A análise comparativa contra outras cultivares monocotiledôneas (*Spirodela*

polirhiza, *Oryza sativa* e *Zea mays*) revelou que estas espécies compartilham 8202 famílias gênicas conservadas. Contudo, *Lemna minor* compartilha quase 70% do proteoma teórico de *Spirodela*, apresentando 6443 genes descritos como *Lemna*-específicos.

Por fim, outro importante resultado do genoma de *Lemna minor* foi obtido a partir da anotação genética funcional, que mostrou o incremento de proteínas envolvidas em processos catabólicos, de atividade hidrolase, de resposta a estímulos abióticos, extracelulares e endógenos, de biossíntese e de metabolismo de carboidratos. Sugerindo sua contribuição para sucesso de *Lemna minor* na colonização de águas residuais e na sua ampla adaptação climática, com manutenção de suas relevantes e potenciais características para biotecnologia (Van Hoeck et al., 2015).

Análises ômicas de lentilhas-d'água revelam o quão instigante e estimulante é a pesquisa destas pequenas plantas: os genomas, transcriptomas e proteomas de lentilhas-d'água possibilitam e trazem à tona novas percepções sobre a biologia e evolução dos clones estudados, mas apontam para uma longa distância a ser percorrida para compreensão mais ampla da família Lemnaceae.

2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LENTILHAS-D'ÁGUA

As lentilhas-d'água são utilizadas há séculos, devido a sua importância na alimentação animal, evidenciado principalmente no sudeste e leste asiático, mas o crescimento rápido e propagação clonal são certamente as principais características das lentilhas-d'água que viabiliza e suporta as suas diversas aplicações biotecnológicas potenciais. Essas características, associadas ao elevado teor de amido, estimulam o desenvolvimento de estudos e pesquisas para exploração destas pequenas macrófitas aquáticas (Zhao et al., 2012; Lam et

al., 2014; Appenroth et al., 2015). Dentre as potenciais aplicações, as lentilhas-d'água se destacam na produção de biomassa compatível com a produção de bioenergia (Cui e Cheng, 2015), no tratamento de efluentes urbanos e rurais (Chaudhary e Sharma, 2014) e como biofábrica (Stomp, 2005).

2.3.1 Produção de biomassa para bioenergia

As lentilhas-d'água apresentam taxa de crescimento quase exponencial com menor tempo de duplicação (Korner et al., 2003), superando a produção de biomassa da maioria das culturas terrestres (Muradov et al., 2010), que representa enorme quantidade de CO₂ sequestrado da atmosfera, e consequente relevante liberação de O₂ (Silva et al., 2012). Assim, a utilização da biomassa de lentilhas-d'água como matéria-prima para bioenergia se destaca ao se adequar ao conceito de Carbono Neutro, onde a quantidade equivalente de CO₂ consumida para geração de energia é igual ou maior a quantidade de CO₂ lançada na atmosfera em seu processo produtivo e pela queima do biocombustível. Além disso, a produção alternativa de biomassa a partir de ambiente aquático oferece vantagens quando não compete por terras agrícolas e favorece a eficiência fotossintética, sendo capaz de suportar elevadas taxas de crescimento, superando a maioria das culturas terrestres conhecidas (Muradov et al., 2010).

Neste contexto, estudos recentes têm investigado o potencial da biomassa de lentilhas-d'água para produção de bioenergia, seja biogás (Muradov et al., 2010; Wu et al., 2014), biodiesel (Campanella et al., 2012) ou, principalmente, bioetanol (Xu et al., 2011; Ge et al., 2012; Yu et al., 2014; Zhao et al., 2015a). Contudo, o bioetanol têm se destacado, considerado como produto de interesse mundial e, no Brasil, integra a matriz energética nacional desde 1970 (Amorim et al., 2011).

Como matéria-prima para produção de bioetanol, a biomassa de lentilha-d'água têm se mostrado promissora por sua elevada produtividade, por apresentar pouca lignina (Zhao et al., 2014) e por seu elevado teor de amido, que pode variar de 3% a 75% do seu peso seco, dependendo da espécie e das condições de cultivo (Landolt e Kandeler, 1987).

O amido é o principal metabólito energético armazenado em plantas durante a fotossíntese. É um polímero natural formado por dois homopolímeros de D-glicose (homopolissacarídeo): amilose, com estrutura linear; e amilopectina, com estrutura ramificada. Amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Enquanto amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -1,4 e α -1,6 (Fasahat et al., 2014). Em um estudo recente, Zhao et al. (2014) demonstraram que a parede celular de *Lemna minor* é composta por 43,7% de celulose, 20% de pectina e baixas quantidades de hemicelulose e lignina: 3,5% e 3%, respectivamente. O estudo ainda demonstrou que os carboidratos representam 51,2% (p/p) da biomassa de lentilha-d'água, que apresentou relevante teor de amido (19,9%), concluindo que a proporção de açúcares fermentescível corresponde a 33,1% da biomassa total, o que corrobora o potencial para produção de bioetanol com baixo custo.

Além disso, a produção e o acúmulo de amido podem ser induzidos em lentilhas-d'água sob condições adversas, como déficit de nutrientes (Tao et al., 2013; Huang et al., 2014); altas concentrações de nitrogênio e de fósforo (Wang et al., 2014b; Zhao et al., 2015b), típicos de ambientes eutrofizados; salinidade (Sree et al., 2015). Ou por estímulos externos como luminosidade e fotoperíodo (Yin et al., 2015), exposição a hormônios ou reguladores vegetais (Wang e Messing, 2012; Liu et al., 2015a, 2015b; Huang et al., 2015), dentre outros.

A tecnologia utilizada para produção de etanol a partir da biomassa de milho é capaz de converter até 95% do amido de lentilhas-d'água a etanol, que, teoricamente, pode atingir o rendimento de até $6,42 \times 10^3$ l.ha⁻¹ (Cui et al., 2011; Xu et al., 2011; Xu et al., 2012; Ge et al., 2012). Este sistema de produção pode ser tornar ainda mais atrativo quando considera o baixo teor lignina, que pode reduzir as etapas de pré-tratamento ou dosagem de enzimas na sacarificação do amido, tornando a produção de bioetanol a partir de lentilhas-d'água economicamente rentável (Ge et al., 2012).

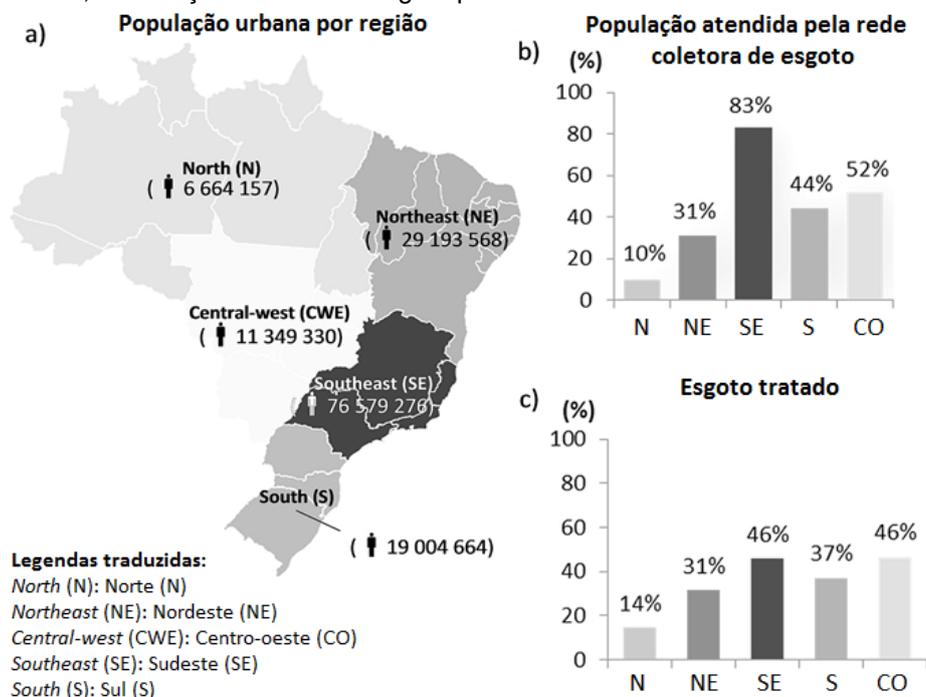
2.3.2 Fitorremediação e tratamento de águas residuais

A importância da água para manutenção da vida na biosfera dispensa qualquer justificativa para a necessidade de preservá-la (Wade, 2010). Contudo, o rápido crescimento populacional é acompanhado pelo aumento de descargas de águas residuais, que sem o tratamento adequado contamina corpos hídricos naturais e reduz, ainda mais, a disponibilidade deste recurso (Kuraishi e Sharma, 2011). De fato, este modelo é inconsequente e tende a ser severamente agravado se não forem adotadas medidas urgentes para aumentar a eficiência do uso e reuso da água e sua conservação, para garantir a produção de alimentos e as atividades humanas, além de minimizar os danos ambientais, de gerações futuras.

No Brasil, este cenário é caótico, quando apenas pouco mais da metade da população tem acesso à rede coletora de esgoto, e quando apenas 35% do esgoto coletado é adequadamente tratado, isto em seu cenário mais otimista. A Figura 5 demonstra a relevância e a necessidade de investimentos massivos e emergenciais para minimizar os danos futuros deste cenário nas regiões norte e

nordeste, principalmente, onde o sistema de coleta e tratamento de esgotos é ainda mais agravado (Machado et al., 2017).

Figura 5 – Cenário brasileiro de tratamento de esgoto no ano de 2014: a) População urbana por região; b) percentual da população urbana com acesso a rede coletora de esgoto; c) percentual de esgoto tratado, em relação ao total de esgoto produzido.



Fonte: Machado et al. (2017), adaptado.

Dentre os sistemas conhecidos, a fitorremediação é uma das principais tecnologias *eco-friendly* e de baixo custo com potencial para ser aplicada em sistemas de tratamento de águas residuais, quando comparada aos sistemas tradicionais (Priya et al., 2012). Os principais mecanismos de fitorremediação são a fitotransformação, bioremediação da rizosfera, fitoestabilização, fitoextração e a rizofiltração, sendo este último mais investigado em lentilhas-d'água (Chhotu e Fulekar, 2009)

Estudos têm demonstrado a eficiência de sistemas de lentilhas-d'água para tratamento de águas residuais urbanas e rurais (Priya et al, 2011; Xu e Shen, 2011; Mohedano et al., 2012a; 2012b) até efluentes industriais (Weltje et al., 2002; Guendouz et al., 2013; Saha et al., 2015).

As lentilhas-d'água são descritas como eficientes para remoção de relevantes contaminantes hídricos, dentre eles: i) compostos nitrogenados e fosfatados (Cheng et al., 2002; Liu et al., 2017); ii) metais pesados (Bokhari et al., 2016); iii) arsênico (Goswami et al., 2014); iv) cianotoxinas, toxinas produzidas por cianobactérias que atingem severamente outros organismos, inclusive seres humanos (LeBlanc et al., 2005); v) boro, composto encontrado em águas poluídas e dessalinizadas (Del-Campo Marín e Oron, 2007); vi) zinco, por exemplo, *Lemna gibba* é capaz de acumular 28,8mg Zn por g peso fresco (Khellaf e Zerdaoui, 2012); e, vii) fármacos (Reinhold et al., 2010). Estes estudos demonstram que sistema de tratamento de efluentes baseado em lentilhas-d'água podem ser implementados como um sistema complementar para contaminantes específicos não removidos por sistemas físico-químicos globais de tratamento, contribuindo para o aumento do custo-benefício.

A exemplo da Índia (Kumar et al., 2015), lentilhas-d'água podem contribuir significativamente para melhoria do cenário brasileiro atual de tratamento de águas residuais, a partir da inclusão de sistemas naturais de tratamento de efluentes alternativamente em seu projeto sanitário, sendo estes economicamente viáveis e tecnicamente eficientes.

2.3.3 Engenharia genética e bioprodução

O desenvolvimento de pesquisas de lentilhas-d'água têm sido estimulado e encorajado, visando sua utilização como planta modelo e cultivada, reconhecendo a necessidade de avançar na transformação genética para bioprodução e para seu melhoramento (Zhao et al., 2012; Lam et al., 2014; Appenroth et al., 2015).

Na engenharia genética, as lentilhas-d'água são utilizadas em um percentual relevante de registros de patentes, associada ao seu potencial para

bioprodução, que é amplamente discutido (Stomp, 2005). Por exemplo, o método para transformação genética de lentilhas-d'água, utilizando as técnicas de biobalística e de transferência de DNA (T-DNA) mediada por *Agrobacterium* estão disponíveis desde 1998.

Os primeiros estudos utilizando lentilhas-d'água geneticamente modificada pela tecnologia T-DNA mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, foram publicados por Sun et al. (2007) e Vunsh et al. (2007). *Lemna minor* clone 8627 foi utilizada para expressar uma enzima celulolítica, a endoglucanase E1 de *Acidothermus cellulolyticus*, demonstrando eficientemente esta capacidade (Sun et al., 2007). Enquanto, *Spirodela oligorrhiza* (clone SP) modificada aumentou em mais de 25% do total de proteínas solúveis o acúmulo da proteína transgene (Vunsh et al., 2007).

Além disso, diversos estudos têm sido publicados demonstrando o uso de lentilhas-d'água como sistemas para bioprodução de fármacos (Rival et al., 2008) e de vacinas comestíveis (Firsov et al., 2015; Bertran et al., 2015).

O cultivo e o processamento de transgênicos é sempre um tema polêmico que envolve discussões desde sua biossegurança, inclusive alimentar, até seus efeitos ecológicos. Contudo, já estão disponíveis tecnologias para transformação genética de lentilhas-d'água com capacidade de contenção e controle do transgene (Nguyen et al., 2012; Cantó-Pastor et al., 2015).

Este breve levantamento, sugere que o melhoramento genético de lentilhas-d'água, seja para bioprodução, seja para produção de bioenergia, é um vasto campo de investigação. Neste sentido as pesquisas ômicas podem contribuir significativamente para melhorar a compreensão da biologia e evolução destas pequenas plantas aquáticas.

2.4 PROTEÔMICA DE PLANTAS

O desenvolvimento e a produtividade das plantas podem ser influenciados por diversos tipos de estímulos, seja um fator biótico ou abiótico. Estudos moleculares de um organismo submetido a condições ou fatores de estresse podem contribuir para melhorar a compreensão de diversos processos biológicos associados. Por exemplo, teor de amido em lentilhas-d'água, característica desejada para produção de bioetanol, por exemplo, pode ser significativamente induzido por diversos estresses abióticos, anteriormente relatados. Isto porque as plantas respondem ao estresse ambiental ativando mecanismos de expressão gênica diferencial, o que resulta em mudanças em nível transcricional, traducional e metabólico, buscando superar o estresse e manter o seu estado fisiológico (Hakeem et al., 2012).

Neste contexto, a análise proteômica permite a investigação das proteínas expressas, a atribuição de função a estas proteínas e, ainda, explicar como essas funções proteicas responde às mudanças das condições ambientais, resultando num perfil de expressão proteica relacionada aos estímulos investigados. A maioria destas moléculas exibe uma função essencial, quer na regulação da resposta ou quer no processo de adaptação, permitindo que as plantas se recuperem e sobrevivam ao estresse (Hakeem et al., 2012).

O avanço tecnológico e o desenvolvimento de algoritmos permitiram o aumento da cobertura do proteoma e a inferência de aspectos quantitativos de expressão de proteínas e deram suporte a Proteômica quantitativa, que nas últimas décadas têm adquirido mais importância na pesquisa com plantas de interesse biotecnológico e comercial (Vanderschuren et al., 2013).

Dentre as técnicas de análise proteômica, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, separação isoelétrica seguida de eletroforese de misturas complexas de proteínas, genericamente conhecida como 2D-PAGE, é amplamente utilizada. A 2D-PAGE ganhou ênfase após melhorias em reprodutibilidade e no desenvolvimento de pacotes de software e hardware, permitindo a quantificação dos níveis de expressão de proteínas a partir das imagens de géis. A combinação da 2D-PAGE com técnicas de sequenciamento de proteínas como o método de degradação de Edman e, mais recentemente, a Espectrometria de Massas (MS), foram responsáveis pelo grande aumento de estudos proteômicos (Vanderschuren et al., 2013). No entanto a análise 2D-PAGE é considerada laboriosa passível a erros de operacionalização que refletem diretamente na reprodutibilidade.

Os recentes avanços na instrumentação da MS e sua associação a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), genericamente LC-MS/MS, permitiram maior separação do analito e o aumento na resolução de massas, possibilitando maior escala de sequenciamento e identificação de proteínas, assim como a quantificação direta, baseada na contagem espectral, ou através de uma marcação (Vanderschuren et al., 2013). A principal vantagem da análise via LC-MS, além da maior escala, se dá por não exigir a confecção de géis de poliacrilamida e etapas laboriosas da 2D-PAGE.

A abordagem LC-MS/MS foi utilizada em dois estudos de análise proteômica de lentilha-d'água (*Landoltia punctata*) recentemente publicados, para investigação da indução do acúmulo de amido por exposição de *Landoltia punctata* ao déficit de nutrientes (Huang et al., 2014) e ao regulador vegetal uniconazole (Huang et al., 2015).

De forma geral, a proteômica não se baseia somente na determinação do conjunto de proteínas presentes em uma amostra, o que já pode ser muito desafiador, mas também caracterizar as inúmeras, e comumente presentes, isoformas proteicas, produtos de modificações pós-traducionais sofridas e, por fim, como essas proteínas interagem entre si (Aebersold e Mann, 2003; Tyers e Mann, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão gênica, em nível traducional, de lentilha-d'água quando cultivada em água residual antropogênica, associada à produção de biomassa e bioenergia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Coletar e isolar linhagens nativas de lentilha-d'água, isoladas de corpos d'água e estações de tratamento de esgoto (ETE) na região metropolitana de Recife-PE;;
2. Propagar e estabelecer *in vitro* populações clonais de lentilhas-d'água nativas;
3. Identificar, a nível de espécie, os clones propagados e estabelecidos no cultivo *in vitro*;
4. Caracterizar clones de lentilha-d'água quanto à produção de biomassa e potencial fitorremediador de efluente de ETE;
5. Obter o perfil proteico 2D-PAGE de lentilha-d'água cultivada a partir de água residual de ETE e meio de cultivo;
6. Detectar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) em lentilha-d'água cultivada em água residual de ETE;
7. Obter espectro de massas (MALDI-ToF/ToF) dos DAPs;
8. Identificar e anotar presumivelmente os DAPs.
9. Inferir possíveis mecanismos de resposta metabólica de lentilha-d'água durante ganho de biomassa e acúmulo de amido.

4 CAPITULO I

Diversidade biológica de clones de *Lemna aequinoctialis* (L.) influencia a produção de biomassa e fitorremediação de efluente¹

Adauto Gomes Barbosa Neto¹, Marciana Bizerra de Moraes¹ e Tercilio Calsa Junior¹.

¹Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

¹ Artigo a ser submetido para publicação no periódico “*Bioenergy research*”, ISSN: 1939-1234, fator de impacto: 3.309, qualis A2 em CB1.

1 **Diversidade biológica de clones de *Lemna aequinoctialis* (L.) influencia a**
2 **produção de biomassa e fitorremediação de efluente**

3 Aduino Gomes Barbosa Neto¹, Marciana Bizerra de Moraes¹ e Tercilio Calsa
4 Junior¹

5 ¹. Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética,
6 Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE,

7 **Resumo**

8 *Lemna aequinoctialis* é um membro da família botânica *Lemnaceae*, que
9 agrupa as menores angiospermas descritas. Popularmente conhecidas como
10 lentilhas-d'água ou *duckweeds*, em inglês, têm despertado interesse
11 biotecnológico no tratamento de efluentes e para bioenergia. As lentilhas-d'água
12 são macrófitas aquáticas flutuantes, monocotiledôneas e de metabolismo C3, cuja
13 diversidade genética está intimamente relacionada as potenciais aplicações
14 biotecnológicas. Neste contexto, nove clones de *L. aequinoctialis* foram cultivados
15 *in vitro* usando meio de cultura SH 1X e 0,5X, a 25±2°C, 16/8 h luz/escuro e
16 intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Parâmetros de crescimento, biomassa,
17 teor de amido, pigmentos fotossintetizantes e a atividade das enzimas
18 antioxidativas SOD, APX e CAT dos clones foram avaliados. Foi observado baixa
19 diversidade genética das sequências da região intergênica cloroplastidial *atpF-*
20 *atpH* nos clones de *L. aequinoctialis*. Contudo, comparativamente, no cultivo *in*
21 *vitro*, o meio SH 0,5X induziu diferenciação fenotípica dos clones em relação ao
22 meio SH 1X. Os clones M2, RC e DI, selecionados para o bioensaio de
23 fitorremediação, como um sistema complementar de estação de tratamento de
24 esgoto doméstico, foram capazes de reduzir DQO até 94,8%, de remover entre

25 36,3% e 39,3% do nitrogênio total, e entre 37,8% e 57,1% do fósforo total,
26 produzindo em média até 150 g.m⁻² de biomassa, com potencial para produção de
27 bioetanol. Os dados demonstram o potencial plástico dos clones de *L.*
28 *aequinoctialis*, sendo o cultivo *in vitro* compatível para avaliação e seleção de
29 genótipos candidatos para aplicações biotecnológicas de tratamento
30 complementar de efluente e produção de biomassa e bioenergia.

31 **Palavras-chave:** Lemnaceae; Plasticidade fenotípica; Genótipo

32 1. Introdução

33 As lentilhas-d'água são pequenas plantas aquáticas, macrófitas flutuantes,
34 monocotiledôneas da família Lemnaceae, consideradas as menores
35 angiospermas descritas. Atualmente, esta família botânica é composta por 37
36 espécies, distribuídas em cinco gêneros monofiléticos: *Spirodela* (mais primitivo);
37 *Lemna*; *Landoltia*; *Wolffiella*; e *Wolffia* (mais derivado) (Landolt, 1986; Les et al,
38 1997; Landolt, 1998; Les e Crawford, 1999; Les et al., 2002; Bog et al., 2010).

39 As lentilhas-d'água são facilmente encontradas em corpos d'água de baixo
40 fluxo, com ou sem ocorrência sazonal, além de apresentar capacidade de se
41 propagar em águas residuais antropogênicas. Estas plantas têm despertado o
42 interesse da comunidade científica como um modelo para a biologia evolutiva e
43 fisiologia vegetal, mas têm se destacado como cultura para a bioenergia e
44 fitorremediação de águas residuais (Zhao et al., 2012). Quando estabelecida, a
45 lentilha-d'água é capaz de reduzir quantidades relevantes de dióxido de carbono
46 no ar e de nitrogênio e fósforo em águas residuais (Stomp, 2005).

47 Com capacidade de dobrar a biomassa a cada 16-24 h em condições
48 ambientais favoráveis, as lentilhas-d'água possuem o crescimento superior a

49 maioria das plantas (Peng et al., 2007), podendo atingir uma produção anual
50 aproximada de 100 ton.ha⁻¹ de peso seco, o que representa um rendimento em
51 biomassa mais elevado do que a maioria das culturas acumuladoras de amido
52 (Cui e Cheng, 2015). De fato as lentilhas-d'água podem apresentar elevado teor
53 de amido (até a 75% de peso seco), dependendo da espécie da lentilha-d'água e
54 das condições de cultivo (Landolt e Kandeler, 1987), com relevante potencial de
55 aplicação na produção de bioetanol (Xu et al., 2012).

56 Assim, sistemas de fitorremediação de águas residuais associada à fazenda
57 de cultivo de lentilhas-d'água e destinação da biomassa produzida para a
58 produção de bioetanol é uma alternativa ambientalmente amigável e
59 economicamente viável, capaz de agregar valor ao tratamento convencional de
60 águas residuais (Chaudhary e Sharma, 2014). Além disso, a biomassa aquática
61 oferece vantagens quando não compete por terras agrícolas e apresenta taxa de
62 crescimento mais elevada do que as culturas terrestres conhecidas (Muradov et
63 al., 2010).

64 As lentilhas-d'água apresentam distribuição cosmopolita e foram descritas em
65 ambientes tropicais e subtropicais no Brasil como no semiárido nordestino, bioma
66 "Caatinga", no "pantanal mato-grossense" e na Mata Atlântica (Bezerra e França,
67 1999). A zona tropical, ao contrário da zona temperada, oferece condições
68 favoráveis ao crescimento de lentilhas-d'água ao longo de todo o ano,
69 contribuindo para competitividade como planta cultivada. Apesar da ampla
70 distribuição, foi relatado que a diferenciação geográfica de lentilhas-d'água tem
71 um papel significativo na sua diversidade genética, o que pode influenciar suas
72 potenciais aplicações biotecnológicas (Xue et al., 2012). Bergmann et al. (2000)
73 relatou que o potencial de lentilhas-d'água pode estar mais fortemente associado

74 ao ambiente a partir do qual foi isolado, do que a espécie, o genótipo, sendo a
75 caracterização *in vitro* um método atraente de seleção.

76 Neste contexto, o estudo teve como objetivo caracterizar a nível genético e
77 fenotípico clones de lentilhas-d'água isolados na Região Metropolitana do Recife,
78 Pernambuco (PE), no nordeste brasileiro, cultivados em meio de cultivo SH
79 (Schenk e Hildebrandt, 1972) em duas forças iônicas, sob condições *in vitro*. A
80 partir da observação do relevante potencial plástico dos clones de *L.*
81 *aequinoctialis*, quatro clones foram caracterizados quanto ao potencial de
82 fitorremediação de efluente da estação de tratamento de esgoto (ETE) da
83 Mangueira, Recife, PE.

84 A ETE Mangueira é dedicada ao tratamento de esgoto doméstico, composta
85 por um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*Up flow Anaerobic*
86 *Sludge Blanket reactor*, reator UASB) e uma subsequente lagoa de polimento com
87 um tempo de retenção hidráulico de 8 h e 3,5 dias, respectivamente,
88 apresentando eficiência entre 60% e 90% para redução da demanda química de
89 oxigênio (DQO) (Florencio et al., 2001; Silva et al., 2015). No entanto, mesmo
90 após este processo, ainda são detectadas quantidades significativas de nitrogênio
91 e de fósforo no efluente da ETE, sendo compatíveis para reutilização agrícola
92 (Silva et al., 2015), mas que no ambiente podem contribuir para a eutrofização de
93 corpos hídricos (Conley et al., 2009). Conseqüentemente, se faz necessária etapa
94 pós-tratamento para a redução máxima destes poluentes, sendo o baixo custo e a
95 eficiência, características desejáveis de um pós-tratamento. Neste contexto, a
96 lentilha-d'água foi avaliada como uma potencial alternativa para o tratamento de
97 esgoto doméstico (Steen et al., 1999; Priya et al., 2012).

98 A avaliação do crescimento, da produção de biomassa, do teor de amido e dos
99 pigmentos fotossintéticos, bem como do rendimento teórico em etanol permitiu a
100 caracterização fenotípica dos clones propagados, , revelando o potencial plástico
101 dos clones de *L. aequinoctialis* e sua diversidade biológica, em contraste com sua
102 identificação molecular e com a análise fenética a partir da sequência intergênica
103 *atpF-atpH* cloroplastidial.

104 Para avaliar o estado redox das lentilhas-d'água ao final do experimento a
105 atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD, CE: 1.15.1.1),
106 ascorbato peroxidase (APX, CE: 1.11.1.11) e catalase (CAT, CE: 1,11. 1.6) foi
107 realizada. A modulação destas enzimas foram significativamente diferente entre
108 os clones, destacando-se o papel da APX, para ambos os meios de cultivos,
109 reforçando o potencial plástico de *L. aequinoctialis* para se adaptar às condições
110 ambientais testadas.

111 A caracterização genética e fenotípica e o estabelecimento do cultivo *in vitro*
112 de clones nativos de lentilhas-d'água podem contribuir para o desenvolvimento de
113 pesquisa básica e aplicada para questões prioritárias em biotecnologia e biologia
114 vegetal.

115 **2. Material e Métodos**

116 2.1 Coleta, isolamento e propagação *in vitro* de lentilhas-d'água

117 Amostras de lentilhas-d'água foram coletadas na Região Metropolitana do
118 Recife, estado de Pernambuco, no nordeste do Brasil; fora de áreas de proteção
119 (Tabela 1). Não foram coletadas espécies protegidas ou ameaçadas de extinção,
120 dispensando a necessidade de licença específica ou permissão legal. O material
121 foi coletado e transportado na própria água do local de coleta até o laboratório.

122 No laboratório, 100-200 frondes foram submergidas em solução de 1% de
 123 hipoclorito de sódio (NaClO) durante 30 s e lavadas com H₂O destilada
 124 autoclavada para assepsia. Em seguida, as plantas foram transferidas para meio
 125 MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força (0,5X), pH 5,8, contendo 10,0 g.L⁻¹ de
 126 sacarose. Após brotamento, uma única fronde foi transferida para MS 0,5X para a
 127 propagação clonal do isolado de lentilha-d'água, a partir de cada ponto de coleta.
 128 Contudo, nos pontos de coleta 1 e 2, ETE Mangueira e *campus* UFPE,
 129 respectivamente, foram isolados dois clones para cada (Tabela 1).

130 **Tabela 1.** Descrição dos locais de coleta de lentilhas-d'água na região metropolitana de Recife,
 131 Pernambuco, Brasil.

Coleta	Local da coleta	Mês/Ano	Latitude e longitude	Clone
1	Estação de Tratamento de Esgoto da Mangueira, Recife-PE	12/2013	8°4'37.34"S, 34°55'30.50"W	M1 M2
2	Alagado sazonal, <i>campus</i> UFPE, Recife-PE	12/2013	8°4'27"S, 34°57'8.06"W	U1 U2
3	Alagado sazonal, Paulista-PE	09/2014	7°54'18.21"S, 34°50'10.82"W	PA
4	Estação de tratamento biológico, Itapissuma-PE	02/2015	7° 48' 5.72"S, 34°54'10.69"W	AL
5	Margem do rio Capibaribe, São Lourenço da Mata-PE	01/2015	7°59'59.85"S, 35°2'45.34"W	RC
6	Alagado sazonal, Dois Irmãos, Recife-PE	01/2015	8°1'22.33"S, 34°57'20.48"W	DI
7	Canal do Araxá, Paulista-PE	04/2015	7°54'6.90"S, 34°50'20.65"W	CA

132 2.2 Manutenção e condições de cultivo *in vitro*

133 Os nove clones propagados foram mantidos em meio SH (Schenk e
 134 Hildebrandt, 1972), ½ força (0,5X), pH 5,8, suplementado com sacarose 10,0 g.L⁻¹
 135 e mio-inositol 1,0 g.L⁻¹. O cultivo *in vitro* foi conduzido em sala de crescimento a
 136 25±2 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa a 50 μmol.m⁻².s⁻¹.

137 Para o experimento, 10 frondes foram transferidas para 50 mL do meio de
 138 cultivo SH 0,5X ou 1X (completo), experimentos independentes, adicionado de
 139 sacarose 10,0 g.L⁻¹ e mio-inositol 1,0 g.L⁻¹, usando potes de 350 mL e área

140 circular de 28 cm², em triplicata. O manuseio foi realizado em câmara de fluxo
141 laminar. Os experimentos foram conduzidos por 10 dias.

142 2.3 Identificação molecular e diversidade genética dos clones de lentilhas-d'água

143 A extração de DNA total foi realizada utilizando o protocolo CTAB (2% CTAB,
144 25 mM EDTA, 2 M NaCl, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0) descrito por Doyle e Doyle
145 (1991). Para amplificação da sequência intergênica *atpF-atpH* plastidial, foi
146 realizada PCR em 25 µL de solução contendo: 40 ng de DNA total; 15,95 µL de
147 H₂O MilliQ; 2,5 µL de 10x buffer; 0,4 mM dNTP; 3,25 mM MgCl₂; 1U Taq DNA
148 polimerase (Invitrogen, EUA) e 0,8 µM dos *primers* (5'-
149 ACTCGCACACTCCCTTTCC-3' e 5'- GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT-3'),
150 descritos por Borisjuk et al. (2015). A solução foi submetida 94 °C por 2 min para
151 desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos a 92 °C por 15 s, a 50 °C por 30 s e a
152 72 °C por 50 s, e extensão final a 72 °C por 10 min. Água MilliQ e DNA total de
153 *Saccharum* sp. foram utilizados como controle negativo e positivo,
154 respectivamente.

155 Os fragmentos amplificados, a partir de triplicatas, foram visualizados em gel
156 de agarose 2% após eletroforese (15 V.cm⁻¹) em tampão TAE 1x (4M Tris, 20 mM
157 ácido acético, 1 mM EDTA) e purificados a partir da solução de PCR usando o kit
158 "*Invisorb, Fragment CleanUp*" (Stratec, DE). Os fragmentos purificados foram
159 sequenciados na Plataforma de Sequenciamento de DNA (UFPE, Recife), usando
160 o *Genetic Analyzer 3500*, conforme recomendações do fabricante (Life
161 Technologies, EUA).

162 As sequências foram editadas no programa BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999). As
163 sequências consenso foram analisadas por BLASTN contra banco de dados
164 "*Barcode Reference*", disponível em <http://epigenome.rutgers.edu/cgi->

165 bin/duckweed/blast.cgi (Borisjuk et al., 2015) para identificação de espécies de
166 Lemnaceae. As sequências ainda foram alinhadas no ClustalW implementado no
167 programa MEGA6 (Tamura et al., 2013). Para análise fenética dos clones de
168 lentilhas-d'água, as sequências *atpF-atpH* foram avaliadas pelo algoritmo de
169 distância derivada usando o método de *neighbor-joining* para a construção de
170 fenograma a partir de 1000 *bootstrap* e *p-distance* (Saitou and Nei, 1987) no
171 programa MEGA6.

172 2.4 Caracterização fenotípica dos clones de lentilhas-d'água

173 2.4.1 Taxa de crescimento, biomassa e teor de amido

174 A taxa de crescimento relativo (TCR), obtida a partir do valor de logaritmo
175 neperiano (\ln) do tempo final ($x_{t_{10}}$) e do tempo inicial (x_{t_0}) em dias (Equação 1) e o
176 tempo de duplicação (TD), que considera o valor de logaritmo neperiano de dois
177 ($\ln 2$) e o valor de TCR (Equação 2) foram calculadas a partir do peso fresco e do
178 número de frondes usando a equação simplificada para dois pontos, inicial (0 dia)
179 e final (10 dias), conforme descrito por Ziegler et al. (2015):

$$180 \quad \text{TCR} = (\ln x_{t_{10}} - \ln x_{t_0}) / (t_{10} - t_0) \quad [1]$$

$$181 \quad \text{TD} = \ln 2 / \text{TCR} \quad [2]$$

182 O rendimento em biomassa ($\text{RB} = \text{g} \cdot \text{m}^{-2}$) foi estimado a partir do ganho real
183 de biomassa em peso fresco, considerando a área superficial de crescimento de
184 $0,002826 \text{ m}^2$.

185 O teor de amido foi determinado por método colorimétrico descrito por
186 Appenroth et al. (2010). Resumidamente, o material vegetal foi macerado em
187 solução HCl 18% (p/v), incubado a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h sob agitação constante. Em
188 seguida o homogeneizado foi centrifugado a 5000 xg por 20 min. Uma alíquota
189 constituída do sobrenadante e de solução de Lugol (0.5% KI p/v e I_2 0.25% p/v em

190 H₂O) na proporção 1:1 foi utilizada para determinação da absorvância a 530 e 605
191 nm. Os valores obtidos foram aplicados nas equações descritas para
192 determinação do teor de amido.

193 2.4.2 Pigmentos fotossintetizantes e metabolismo antioxidante

194 O teor de clorofila a, b e total (a+b) e de carotenoides foi determinado pelo
195 método de extração em acetona 80% descrito por Wang et al. (2014).
196 Resumidamente, as plantas foram maceradas na solução de acetona 80%, em
197 seguida centrifugada a 1.500 xg por 5 min e o sobrenadante foi recuperado para
198 determinação da absorvância a 663, 645 e 470 nm. Os valores foram utilizados
199 para calcular a concentração dos pigmentos.

200 O metabolismo antioxidante de lentilhas-d'água cultivadas *in vitro* foi avaliado
201 a partir da atividade enzimática de SOD, APX e CAT, enzimas envolvidas na
202 resposta ao estresse oxidativo. Para tal, as amostras (plantas) congeladas em N₂
203 líquido foram maceradas e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100
204 mM, pH 7,5; 1 mM EDTA; 3 mM DTT e 20% PVPP, gelado, na proporção de 1 g
205 de planta para 3 mL de tampão (p/v). O extrato foi centrifugado a 10.000 xg, 4 °C
206 por 30 min para recuperação do sobrenadante, que foi estocado a -20 °C até os
207 ensaios de atividade enzimática (Azevedo et al., 1998). O teor de proteínas totais
208 solúveis foi determinado pelo método de Bradford (1976).

209 A atividade da SOD foi mensurada pela inibição da redução fotoquímica de
210 nitroazul de tetrazólio (NBT) em 3 mL de solução de reação (tampão fosfato 85
211 mM, pH 7,8, 75 µM NBT; 3 µM riboflavina; 13 mM metionina; 0,1 mM EDTA) e 50
212 µL do extrato enzimático. A solução foi incubada sob luz branca por 5 min, em
213 seguida foi obtido o valor de absorvância a 560 nm. Os valores de atividade foram
214 expressos em U SOD.mg⁻¹ proteína (Giannopolitis e Ries, 1977).

215 A atividade de APX foi mensurada a partir do monitoramento da taxa de
216 oxidação do ascorbato. O ensaio enzimático foi realizado em 650 μL de tampão
217 fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5, 100 μL de ascorbato 5 mM, 100 μL de EDTA
218 100 mM, 100 μL de H_2O_2 1 mM e 50 μL do extrato enzimático. Após 60 s de
219 reação a 30 °C, o valor de absorbância a 290 nm foi obtido (Nakano e Asada,
220 1981).

221 A atividade da CAT foi determinada pela decomposição de H_2O_2 em 1,5 mL
222 de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, e 60 μL de H_2O_2 0,1 M. A reação
223 foi iniciada após a adição de 50 μL do extrato enzimático, após 60 s de reação, foi
224 obtida o valor Δ da absorbância a 240 nm a 25 °C (Havir e Mchale, 1987). A
225 atividade específica de APX e CAT foi expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína.

226 2.5 Crescimento, produção de biomassa e rendimento teórico em bioetanol de
227 lentilhas-d'água cultivadas em efluente

228 Os clones M2, DI e RC foram cultivados em águas residuais (pós-tratamento)
229 da ETE Mangueira, Recife, Pernambuco, Brasil, para avaliar o uso potencial da
230 lentilha-d'água em tratamento complementar. Para isso, foram coletados 20 L de
231 efluente na saída da lagoa de polimento, último passo de tratamento, em um
232 único galão, próprio para coleta, a fim de garantir homogeneidade da amostra. O
233 efluente foi usado para determinar a concentração de nitrogênio total (NT),
234 nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_4\text{-N}$), fósforo total (PT) e a demanda química de oxigênio
235 (DQO) na empresa Lógica Ambiental de acordo com os Métodos Padrão (APHA,
236 2012), antes e após experimento.

237 O bioensaio foi realizado em câmara climática, modelo SL-205/1370/SOLAB,
238 garantindo padronização ambiental a 25 ± 2 °C e 16/8 h claro/escuro, utilizando
239 bandeja plástica transparente de dimensões 22x22x9 cm (LxCxA), contendo 1,5 L

240 de efluente, criando 484 cm² de superfície e 3 cm de profundidade; 1,0 g de
241 frondes saudáveis para cada clone de lentilha-d'água de água foi inoculado no
242 efluente (Densidade de inoculação = 21,1 g.m⁻²) e cultivadas durante 19 dias.
243 Após o período de crescimento, foi avaliada a capacidade de fitorremediação e a
244 produção de biomassa dos clones a partir de efluente.

245 2.6 Análises estatísticas

246 Os dados foram analisados a partir de triplicatas, considerando delineamento
247 experimental inteiramente casualizado, com tratamentos em esquema fatorial 2x9,
248 sendo dois meios de cultivo (SH 1X e SH 0.5X) e nove clones (M1, M2, U1, U2,
249 AL, PA, RC, DI e CA). Os dados foram submetidos à análise de variância
250 (ANOVA) e às médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% e 5% de
251 significância, utilizando o software ASSISTAT (versão 7.7 beta) (Azevedo e Silva,
252 2006). As variáveis de TCR, RB, pigmentos fotossintéticos (clorofilas a, b e total),
253 carotenoides, teor de amido e atividade específica das enzimas SOD, APX e CAT,
254 para cada meio de cultivo, foram confrontadas pela análise multivariada de
255 componentes principais no software Fitopac2 (Shepherd e Urbanetz, 2010).

256 3. Resultados e Discussão

257 3.1 Identificação molecular dos clones de lentilhas-d'água

258 Nove clones de lentilhas-d'água foram obtidos a partir dos sete pontos de
259 coleta na região metropolitana do Recife (Tabela 1). Três clones foram isolados a
260 partir de população coletada em estação de tratamento de esgoto (M1, M2 e AL);
261 Quatro clones de áreas sazonalmente inundada por águas pluviais (U1, U2, PA e
262 DI), apenas um isolado de margem de rio (RC) e de canal receptor de esgoto
263 doméstico (CA). Apenas dois pontos de coleta (local 1 e 2) apresentaram plantas

264 com diferenças morfológicas, sugerindo baixa diversidade genética. Nenhum dos
265 locais de coleta se localizava em áreas protegidas.

266 O espaçador intergênico plastídico *atpF-atpH* gerou um único fragmento, com
267 tamanho esperado, gerando sequências *barcode* para os nove clones. O
268 comprimento das sequências *atpF-atpH* variou de 598-613 pb entre os clones. A
269 análise BLAST das sequências contra o banco de dados "Barcode Reference",
270 mostrou que os nove clones isolados da região metropolitana de Recife
271 apresentaram alta similaridade e identidade com sequências da espécie *L.*
272 *aequinoctialis* (bitscore > 1075, e-value = 0,0 e identidade > 99%). Esses dados
273 corroboram os resultados de Borisjuk et al. (2015), que confirmaram a
274 identificação de um isolado da ETE Mangueira como também da espécie *L.*
275 *aequinoctialis* mediante código de barras *atpF-atpH*.

276 Inicialmente, o espaçador *atpF-atpH* foi designado como marcador molecular
277 universal para identificação de espécies de lentilhas-d'água (Wang et al., 2010),
278 sendo mais eficiente para a identificação da espécie *L. aequinoctialis* do que o
279 código de barras *psbK-psbI* (Borisjuk et al., 2015). Contudo, para estudos
280 robustos de filogenia da família *Lemnaceae*, o espaçador *atpF-atpH* tem sido
281 utilizado em conjunto com outros marcadores não-codificantes (Borisjuk et al.,
282 2015) ou com genes *housekeeping* (Tang et al., 2014), visando reduzir problemas
283 e limitações para diferenciar espécies estreitamente relacionadas, problemas já
284 descritos. Fato que justifica a análise fenética da sequência intergênica *atpF-atpH*
285 cloroplastidial, para os clones de *L. aequinoctialis* nativos de Recife-PE, realizada
286 neste estudo.

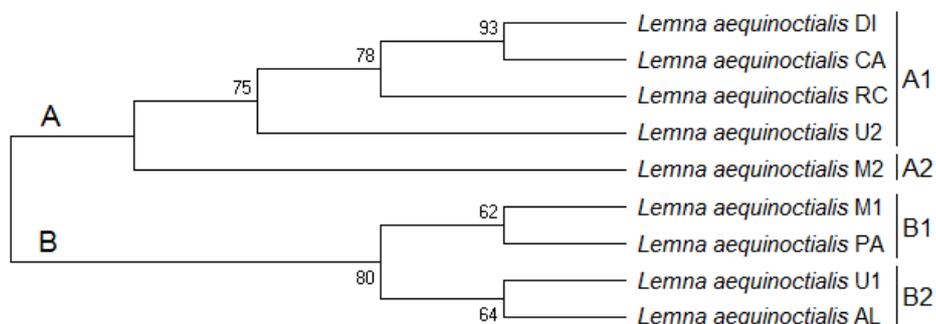
287 O alinhamento revelou 606 caracteres constantes e apenas quatro caracteres
288 variáveis parcimônia-informativos foram detectados. A variação inicial do *atpF-*

289 *atpH* é concordante com outros estudos, porém a variação observada foi menor
290 para os clones isolados em Recife, mostrando maior conservação das
291 sequências, o que pode sugerir uma menor diversidade genética dos clones
292 (Tang et al., 2014). Estes dados são corroborados pela análise de distância
293 genética, que mostrou valor máximo de 0,007 e identidade maior que 97%, em
294 contraste com a diversidade biológica e potencial plástico dos clones nativos de
295 lentilha-d'água.

296 Um estudo prévio de diversidade genética utilizando marcadores ISSR (*Inter-*
297 *Simple Sequence Repeat*) mostrou um valor médio de 0,343 para a distância
298 genética de três linhagens de *L. aequinoctialis*, geograficamente isoladas por
299 distância de 300 a 1200 km (Xue et al., 2012). Enquanto, os locais de coleta na
300 região metropolitana de Recife (Tabela 1) foram separados por distâncias que
301 variaram de 0,45 km (entre os locais 3 e 7) a 30,5 km (entre os locais 1 e 7).

302 A árvore consenso da análise *Neighbor-joining* (NJ) de distância genética das
303 sequências *atpF-atpH* (Figura 1) mostra o agrupamento dos nove clones de
304 lentilhas-d'água em dois grupos (A e B) com cluster bem suportado (75% e 80%
305 *bootstrap*, respectivamente). Cada grupo foi dividido em dois subgrupos: A1
306 composto pelos clones DI, CA, RC e U2 (75% *bootstrap*) e subgrupo A2, formado
307 apenas pela linhagem M2, para o grupo A; o subgrupo B1 composto por M1 e PA
308 (62% *bootstrap*), enquanto B2 agrupou os clones U1 e AL (64% *bootstrap*). No
309 subgrupo A2, a ausência de valor de *bootstrap* no ramo para o clone M2, indica
310 baixo suporte deste clone no clado A. As sequências *barcode atpF-atpH* foi capaz
311 de separar clones obtidos a partir de mesma população coletada (M1 e M2 do
312 local de coleta 1; U1 e U2 do local 2) na análise fenética de NJ. Estes clones

313 apresentaram diferenças morfológicas bem diferenciadas entre si e entre a
 314 população originária, onde se destacava o tamanho e a coloração e das frondes.



315 **Figura 1.** Árvore consenso de análise fenética *Neighbor-joining* para distância genética dos clones
 316 de *Lemna aequinoctialis* isolados na região metropolitana de Recife, Pernambuco, Brasil, a partir
 317 de sequência intergênica *atpF-atpH*, exibindo os valores de *bootstrap* (1.000 replicatas), baseado
 318 em modelo *p-distance*.
 319

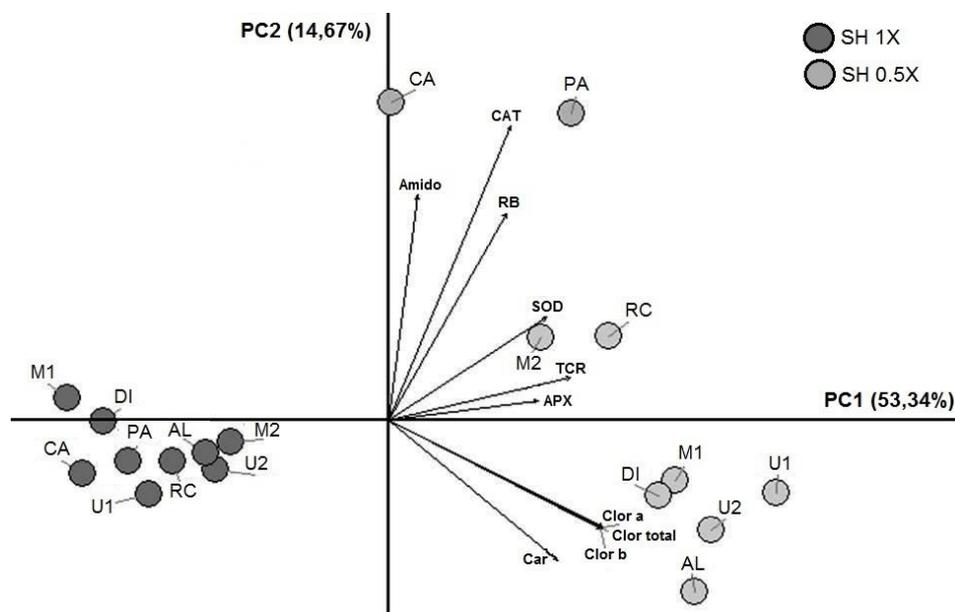
320 3.2 Diversidade fenotípica de clones de *L. aequinoctialis* cultivadas *in vitro*

321 No cultivo *in vitro*, o meio de cultura deve fornecer nutriente adequadamente
 322 para manutenção das características naturais a serem avaliadas. O meio SH tem
 323 sido recomendado para o cultivo de lentilhas-d'água por fornecer concentrações
 324 ótimas de nutrientes (Yu et al., 2014). Contudo, os clones cultivados em meio SH
 325 1X ou 0,5X revelou variação fenotípicas sob condição *in vitro*, incluindo os clones
 326 propagados a partir do mesmo ponto de coleta para ambos meios de cultivo.
 327 Entretanto, o meio SH 0,5X, em geral, induziu respostas mais específicas,
 328 demonstrando o potencial plástico dos clones de *L. aequinoctialis*. Estas
 329 observações sugeriram elevado potencial plástico dos clones.

330 A análise de componentes principais (ACP) foi capaz de diferenciar os clones
 331 cultivados por meio de cultura (Figura 2), SH 1X e SH 0,5X, distintamente, através
 332 do CP2 (componente principal 2), com 14,67% de contribuição, onde todas as
 333 variáveis testadas contribuíram para a diferenciação de SH 0,5X. Contudo, o CP1
 334 (componente principal 1) resolveu, com 53,34% de contribuição, três grupos em

335 SH 0,5X. As variáveis de teor de amido, CAT e RB contribuíram para o
 336 agrupamento dos clones CA e PA, enquanto que SOD, APX e TCR contribuíram
 337 para o agrupamento dos clones M2 e RC. Os clones M1, U1, U2, DI e AL foram
 338 agrupados com base em pigmentos fotossintéticos e carotenoides. Quando
 339 cultivado em SH 1X não foi possível formar grupos das variáveis analisadas.

340 O meio SH (1X e 0,5X) suportou o crescimento *in vitro* dos clones. Embora a
 341 ACP tenha demonstrado que o meio SH 0,5X induz respostas diferentes de TCR,
 342 pigmentos fotossintéticos (Clor a, b e total e Car), teor de amido e atividade de
 343 enzimas do sistema antioxidante (SOD, APX e CAT), em geral, houve incremento
 344 de todos os parâmetros avaliados, com exceção do TD, contribuindo para o
 345 aumento do rendimento em biomassa. Esta tendência apoiou o agrupamento de
 346 clones por padrão fenotípico. Enquanto que no meio SH 1X clones apresentaram
 347 menores variação fenotípicas.



348 **Figura 2.** Gráfico da ACP dos clones de *Lemna aequinocialis* (M1, M2, U1, U2, PA, AL, RC, DI e
 349 CA) cultivados *in vitro* em meio SH 1X e meio SH 0,5X. TCR: Taxa de crescimento relativo; RB:
 350 Rendimento em biomassa; Clor a: clorofila a; Clor b: clorofila b; Clor total: clorofilas totais; Car:
 351 carotenoides; SOD: atividade da superóxido dismutase; APX: atividade da ascorbato peroxidase;
 352 CAT atividade da catalase.
 353

354 Estes dados corroboram a recomendação do meio SH para o cultivo *in vitro*
355 de lentilhas-d'água, ressaltando, que o meio SH 0,5X induziu maior diferenciação
356 fenotípica dos clones cultivados *in vitro*, mostrando-se adequado para avaliação
357 da plasticidade fenotípica de clones de *L. aequinoctialis*, características
358 estreitamente relacionadas com suas potenciais aplicações biotecnológicas,
359 podendo ser utilizado para experimentação *in vitro* como método atraente para a
360 seleção de genótipos de lentilhas-d'água com potencial biotecnológico, visando a
361 avaliação de múltiplos critérios fenotípicos (Bergmann et al., 2000).

362 3.2.1 Crescimento, biomassa e teor de amido

363 Crescimento rápido e elevado teor de amido são algumas das características
364 naturais da lentilhas-d'água mais exploradas em estudos e pesquisa de plantas.
365 Essas características são questões muito relevantes para o potencial biológico e
366 biotecnológico da lentilha-d'água, investigado há décadas pela comunidade
367 científica (Zhao et al., 2012; Lam et al., 2014). No entanto, foi a partir da demanda
368 mundial por bioenergia que contribuiu para um novo *status* no estudo de lentilhas-
369 d'água, apresentando alto rendimento em biomassa com capacidade de acumular
370 elevada quantidade de amido compatível com a produção de biocombustíveis
371 (Cui e Cheng, 2015).

372 A Tabela 2 apresenta os resultados para TCR,TD, RB e teor de amido nos
373 clones de *L. aequinoctialis* após 10 dias de cultivo em meio SH 0,5X e 1X. Os
374 dados demonstram que o meio SH 0,5X induziu respostas para suportar o
375 incremento de crescimento dos clones. Por exemplo, a linhagem DI apresentou
376 incremento de 135% para TCR (Tabela 2).

377 Comparativamente, os clones apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$)
378 para ambos os meios (SH 1X e SH 0,5X), corroborando a plasticidade fenotípica

379 das lentilhas-d'água. Os clones M1 destaca-se apresentando mais alta TCR e RB
 380 e, conseqüentemente, menor TD, em meio SH 1X (Tabela 2). Em meio SH 0,5X,
 381 os clones AL e DI destacaram-se apresentando as maiores TCR e RB e menor
 382 TD. O clone M1 também apresentou TD igual a 1,8 dia, contudo assemelha-se ao
 383 clone PA, com relação a TCR e RB. Enquanto, o clone CA apresentou maior
 384 produção de biomassa, o que parece estar associado ao incremento do tamanho
 385 e peso das frondes em SH 0,5X (Tabela 2).

386 **Tabela 2.** Parâmetros de crescimento, produção de biomassa e teor de amido de clones de
 387 *Lemna aequinoctialis* cultivadas *in vitro* em meio SH 1X e 0,5X. A) TCR: Taxa de crescimento
 388 relativo; TD: Tempo de duplicação; RB: Rendimento em biomassa. Letras minúsculas representam
 389 a diferença de médias entre meios de cultivos (colunas) e letras maiúsculas representam a
 390 diferença de médias entre os clones (linha) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

L. <i>aequinoctialis</i>	TCR (dia ⁻¹)**		TD (dia)**		RB (g.m ⁻²)**		Teor de amido (%)**	
	SH 0,5X	SH 1X	SH 0,5X	SH 1X	SH 0,5X	SH 1X	SH 0,5X	SH 1X
Clone M1	0,37 ^{aAB}	0,31 ^{bA}	1,8 ^{bA}	2,3 ^{aD}	310,9 ^{aAB}	144,4 ^{bA}	5,5 ^{bDE}	7,9 ^{aBCD}
Clone M2	0,34 ^{aBC}	0,29 ^{bA}	2,0 ^{bA}	2,4 ^{aCD}	212,1 ^{aCD}	130,8 ^{bAB}	13,6 ^{aBC}	4,8 ^{bEFG}
Clone U1	0,34 ^{aBC}	0,29 ^{bA}	2,0 ^{aA}	2,4 ^{aD}	134,0 ^{aEF}	99,8 ^{aABC}	2,5 ^{aF}	4,1 ^{aFG}
Clone U2	0,32 ^{aC}	0,22 ^{bB}	2,2 ^{bA}	3,2 ^{aB}	86,2 ^{aF}	65,7 ^{aBC}	13,4 ^{aBC}	6,7 ^{bDEF}
Clone PA	0,37 ^{aAB}	0,23 ^{bB}	1,9 ^{bA}	3,0 ^{aBC}	312,3 ^{aAB}	70,7 ^{bBC}	11,2 ^{aC}	10,4 ^{aAB}
Clone AL	0,39 ^{aA}	0,31 ^{bA}	1,8 ^{bA}	2,3 ^{aD}	181,1 ^{aDE}	83,3 ^{bABC}	4,0 ^{bEF}	7,3 ^{aCDE}
Clone RC	0,34 ^{aBC}	0,21 ^{bB}	2,1 ^{bA}	3,3 ^{aB}	149,4 ^{aDEF}	77,7 ^{bABC}	22,5 ^{aA}	2,6 ^{bG}
Clone DI	0,39 ^{aA}	0,17 ^{bC}	1,8 ^{bA}	4,3 ^{aA}	259,8 ^{aBC}	53,6 ^{bC}	7,5 ^{bD}	12,2 ^{aA}
Clone CA	0,31 ^{aC}	0,23 ^{bB}	2,2 ^{bA}	3,0 ^{aB}	368,8 ^{aA}	107,2 ^{bABC}	15,5 ^{aB}	9,5 ^{bBC}

391 ** Parâmetro apresentou interação significativa dos fatores (meios de cultivo vs. genótipos) ao
 392 nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

393 Os parâmetros de crescimento e o teor de amido também mostrou interação
 394 do genótipo e com as condições de cultivo ($p < 0,01$). No entanto, o teor de amido
 395 apresentou relevante variação entre os meios de cultivo. Por exemplo, o clone RC
 396 foi capaz de aumentar cerca de 7,5 vezes o teor de amido no meio SH 0,5X,
 397 enquanto os clones M1, AL e DI reduziram significativamente o teor de amido.
 398 Curiosamente, o clone RC mostrou o maior teor de amido (22,5%), mesmo tendo

399 mostrado elevada RGR ($0,34 \text{ dia}^{-1}$) em meio SH 0,5X. Diferentemente em SH 1X,
400 o clone RC apresentou TCR menor ($0,21 \text{ dia}^{-1}$) e baixo teor de amido (2,6%).

401 Além do clone RC, observou-se também aumento significativo no teor de
402 amido para os clones M2 (180%), U2 (100%) e CA (64%). Os clones M1, AL e DI
403 mostraram redução significativa do teor de amido quando cultivados em 0,5X SH,
404 de 30%, 45% e 38%, respectivamente. Estes dados mostram o elevado potencial
405 de crescimento das lentilhas-d'água em condições de cultivo *in vitro* e refletem o
406 potencial fenotípico dos clones propagados.

407 Contudo, já tem sido demonstrado que o teor de amido se correlaciona
408 negativamente com a TCR, o que faria a seleção de lentilha-d'água com alta taxa
409 de crescimento e elevado conteúdo de amido simultaneamente muito difícil (Xiao
410 et al., 2013). Embora os dados tenham mostrado alta TCR e elevado teor de
411 amido simultaneamente em alguns clones, não foi possível inferir os possíveis
412 estímulos capazes de induzir o acúmulo observado, dado que a produção e o
413 acúmulo de amido em lentilhas-d'água podem ser induzidos por diversos
414 estímulos, como o déficit de nutrientes (Tao et al., 2013), a luminosidade e o
415 fotoperíodo (Yin et al., 2015), a concentração de nitrogênio e de fósforo (Wang et
416 al., 2014; Zhao et al., 2015), a salinidade (Sree et al., 2015), dentre outros.

417 Tang et al. (2014) observaram que os caracteres morfológicos e bioquímicos
418 podem estar intimamente relacionados com a diversidade genética da lentilha-
419 d'água. A relevante diversidade genética das lentilhas-d'água podem influenciar
420 significativamente suas potenciais aplicações biotecnológicas (Xue et al., 2012).
421 Os dados de crescimento apresentados demonstram a possibilidade de
422 otimização de protocolos de cultivo *in vitro* para a produção de biomassa de
423 lentilha-d'água em condição axênica, necessária para a produção de fármacos

424 (Rival et al., 2008) e moléculas bioativas (Vunsh et al. , 2007), a partir do
425 rastreamento de genótipos compatíveis.

426 3.2.2 *Pigmentos fotossintetizantes e carotenoides*

427 Os pigmentos fotossintéticos clorofilas e carotenoides são essenciais para a
428 fotossíntese, participando da captura da luz e sua conversão em energia
429 bioquímica, além de atuar na função de fotoproteção contra os danos de
430 intensidade luminosa nas células vegetais (Scheer, 2008).

431 O teor de clorofila e carotenoides (Tabela 3) mostrou diferenças significativas
432 entre os meios SH 1X e SH 0,5X, exceto para clone CA que não mostrou
433 diferença nas clorofilas. De modo semelhante, os clones M2, PA e RC não
434 apresentaram diferença significativa entre os meios de cultura para carotenoides.
435 Em geral, observou-se interação entre genótipos e os meios de cultivo com teor
436 de pigmentos fotossintéticos.

437 Comparativamente, os genótipos apresentaram menor variação no teor de
438 clorofilas e carotenoides no meio SH 1X quando comparado ao meio SH 0,5X. O
439 meio SH 0,5X induz incremento da produção de pigmentos fotossintéticos,
440 especialmente do teor de clorofila, enquanto não foram observadas diferenças
441 significativas para clorofila b quando cultivadas em meio SH 1X. O baixo teor de
442 clorofila b e carotenoides também foi observado. Não houve diferença significativa
443 entre os clones de lentilha-d'água para a razão clorofila a/b quando cultivadas em
444 SH 0,5X, contudo, na comparação entre os meios, apenas o clone U1 apresentou
445 diferença significativa para este parâmetro. Em SH 0,5X, a razão de clorofila a/b
446 entre os clones variou de 2,0 a 2,3 e em SH 1X foi observada maior variação,
447 entre 1,8 e 2,5 (Tabela 3).

448 **Tabela 3.** Teor de clorofila a, b e total e carotenoides dos clones de *Lemna aequinoctialis* quando cultivadas em meio SH 0,5X ou 1X. Letras minúsculas
 449 representam a diferença de médias entre meios de cultivos (colunas) e letras maiúsculas representam a diferença de médias entre os clones (linha) pelo
 450 teste de Tukey ($p < 0,05$).

L. <i>aequinoctialis</i>	Clor a (mg.g^{-1})**		Clor b (mg.g^{-1})**		Clor total (mg.g^{-1})**		Ratio Clor a/b*		Car (mg.g^{-1})**	
	SH 0,5X	SH 1X	SH 0,5X	SH 1X	SH 0,5X	SH 1X	SH 0,5X	SH 1X	SH 0,5X	SH 1X
Clone M1	0,54 ^{aC}	0,13 ^{bB}	0,24 ^{aCD}	0,07 ^{bA}	0,78 ^{aD}	0,20 ^{bB}	2,3 ^{aA}	2,0 ^{aBC}	0,08 ^{aAB}	0,01 ^{bB}
Clone M2	0,41 ^{aD}	0,20 ^{bA}	0,19 ^{aDE}	0,08 ^{bA}	0,59 ^{aE}	0,29 ^{bAB}	2,2 ^{aA}	2,5 ^{aA}	0,05 ^{aCDE}	0,04 ^{aA}
Clone U1	0,64 ^{aB}	0,19 ^{bA}	0,29 ^{aABC}	0,08 ^{bA}	0,92 ^{aB}	0,27 ^{bAB}	2,2 ^{bA}	2,5 ^{aA}	0,07 ^{aBC}	0,03 ^{bAB}
Clone U2	0,59 ^{aBC}	0,21 ^{bA}	0,30 ^{aAB}	0,09 ^{bA}	0,89 ^{aBC}	0,30 ^{bA}	2,0 ^{bA}	2,3 ^{aAB}	0,10 ^{aA}	0,04 ^{bA}
Clone PA	0,36 ^{aD}	0,20 ^{bA}	0,17 ^{aE}	0,09 ^{bA}	0,53 ^{aE}	0,29 ^{bAB}	2,1 ^{aA}	2,3 ^{aABC}	0,03 ^{aE}	0,03 ^{aA}
Clone AL	0,69 ^{aA}	0,18 ^{bAB}	0,34 ^{aA}	0,10 ^{bA}	1,04 ^{aA}	0,28 ^{bAB}	2,1 ^{aA}	1,8 ^{aC}	0,05 ^{aCDE}	0,02 ^{bAB}
Clone RC	0,55 ^{aC}	0,20 ^{bA}	0,26 ^{aBC}	0,10 ^{bA}	0,81 ^{aCD}	0,30 ^{bAB}	2,1 ^{aA}	2,0 ^{aABC}	0,04 ^{aDE}	0,03 ^{aAB}
Clone DI	0,58 ^{aBC}	0,19 ^{bA}	0,28 ^{aBC}	0,09 ^{bA}	0,87 ^{aBCD}	0,28 ^{bAB}	2,1 ^{aA}	2,2 ^{aABC}	0,06 ^{aCD}	0,03 ^{bAB}
Clone CA	0,23 ^{aE}	0,19 ^{bAB}	0,10 ^{aE}	0,09 ^{aA}	0,33 ^{aF}	0,27 ^{aAB}	2,2 ^{aA}	2,1 ^{aABC}	0,04 ^{aDE}	0,03 ^{aAB}

451 ** Parâmetro apresentou interação significativa dos fatores (meios de cultivo vs. genótipos) ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

452

453 A variação natural do conteúdo de pigmentos fotossintetizantes entre as
 454 espécies de lentilhas-d'água foi relatada anteriormente (Berg et al., 2002;
 455 Costache et al., 2012). Contudo, aqui é relatada a variação deste pigmentos a
 456 nível clonal na espécie *L. aequinoctialis*, o que pode estar associado à
 457 manutenção da taxa de crescimento e refletir o estado fotossintético da célula
 458 vegetal. Esta relação já foi relatada para lentilhas-d'água submetidas à estresse por
 459 amônio (Wang et al., 2014) e por inoculação de bactéria promotora de
 460 crescimento (Suzuki et al., 2014).

461 3.2.3 Atividade específica de SOD, APX e CAT do sistema antioxidante

462 O metabolismo celular produz espécies reativas de oxigênio (ROS) que em
 463 níveis tóxicos podem causar danos oxidativos à célula vegetal, que desenvolveu
 464 um eficiente sistema de defesa antioxidante para a manutenção do equilíbrio
 465 redox (You e Chan, 2015). A Tabela 4 mostra a atividade das enzimas SOD, APX
 466 e CAT em clones de *L. aequinoctialis* cultivadas em meio SH 1X ou 0,5X.

467 **Tabela 4.** Atividade específica de enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase
 468 (APX) e catalase (CAT), do sistema antioxidante em plantas; nos clones de *Lemna aequinoctialis*
 469 cultivadas em meio SH 1X ou 0,5X. Letras minúsculas representam a diferença de médias entre
 470 meios de cultivos (colunas) e letras maiúsculas representam a diferença de médias entre os
 471 clones (linha) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

<i>L. aequinoctialis</i>	SOD** (U SOD.mg ⁻¹ proteínas)		APX** (μ mol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteínas)		CAT** (μ mol H ₂ O ₂ .min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteínas)	
	SH 0,5X	SH 1X	SH 0,5X	SH 1X	SH 0,5X	SH 1X
Clone M1	15,8 ^{aE}	11,3 ^{bABC}	242,8 ^{aC}	75,4 ^{bD}	9,5 ^{aF}	4,0 ^{bD}
Clone M2	34,6 ^{aBC}	11,4 ^{bABC}	345,2 ^{aA}	259,1 ^{bAB}	13,2 ^{aDEF}	9,8 ^{bAB}
Clone U1	67,1 ^{aA}	10,7 ^{bABC}	292,9 ^{aABC}	139,6 ^{bC}	18,5 ^{aC}	5,2 ^{bCD}
Clone U2	35,1 ^{aBC}	14,8 ^{bAB}	271,4 ^{bBC}	320,5 ^{aA}	14,9 ^{aCD}	8,3 ^{bABC}
Clone PA	29,7 ^{aCD}	8,6 ^{bBC}	307,1 ^{aAB}	141,6 ^{bC}	34,9 ^{aA}	5,8 ^{bBCD}
Clone AL	16,1 ^{aE}	10,6 ^{bABC}	264,3 ^{aBC}	276,5 ^{aAB}	11,5 ^{aDEF}	5,7 ^{bBCD}
Clone RC	26,1 ^{aD}	17,7 ^{bA}	326,2 ^{aAB}	215,4 ^{bB}	13,9 ^{aDE}	12,0 ^{aA}
Clone DI	26,9 ^{aD}	15,2 ^{bAB}	242,9 ^{aC}	140,0 ^{bC}	9,9 ^{aE}	9,0 ^{aABC}
Clone CA	37,9 ^{aB}	7,1 ^{bC}	150,0 ^{aD}	75,1 ^{bD}	23,8 ^{aB}	3,3 ^{bD}

472 ** Parâmetro apresentou interação significativa dos fatores (meios de cultivo vs. genótipos) ao
 473 nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

474 O sistema enzimático antioxidante é constitutivamente ativo em células
475 vegetais onde as enzimas SOD, APX e CAT atuam na primeira via de defesa (Gill
476 e Tujeta, 2010), sendo observadas diferenças intrínsecas aos genótipos ($p < 0,01$)
477 e interação do genótipo com os meios de cultivo ($p < 0,01$). No entanto, os clones
478 foram cultivados *in vitro* em condições igualmente controladas e uniformizadas
479 para ambos os meios de cultura, sugerindo que as respostas do metabolismo
480 oxidativo para aclimatar lentilhas-d'água estão intimamente relacionadas ao
481 genótipo. De fato, estudos relataram que a variação significativa na atividade
482 enzimática entre clones está mais associada aos genótipos do que a resposta das
483 condições ambientais (Caverzan et al., 2012). Por outro lado, em nosso estudo, o
484 meio SH 0,5X induziu um aumento na atividade das enzimas, quando comparado
485 ao meio SH 1X, exceto para os clones U2 e AL que apresentaram uma redução
486 na atividade específica de APX, porém esta diferença foi significativa apenas para
487 o clone U2 (Tabela 4).

488 A eficiência do sistema enzimático antioxidante está, primariamente,
489 associada à modulação da CAT e/ou APX frente à ativação da SOD, que dismuta
490 O_2 em H_2O_2 , ROS metabolizada e eliminada pela ação da APX e CAT, uma vez
491 que a acumulação de H_2O_2 pode ser tão prejudicial quanto o O_2 . (Mittler, 2002).
492 De fato, quando cultivadas em SH 0,5X os clones aumentaram a atividade da
493 enzima SOD e conseqüentemente induz o incremento da atividade aumentada de
494 enzimas APX e CAT, sincronicamente (Tabela 4). O ajuste das enzimas do
495 sistema antioxidante foi eficaz para suportar o aumento da taxa de crescimento
496 observada no meio SH 0,5X, sendo capaz de resolver o desequilíbrio de ROS,
497 uma conseqüência do aumento da atividade metabólica de células vegetais.

498 Estes resultados sugerem refinada modulação das enzimas SOD, CAT e APX
499 nos clones de *L. aequinoctialis*, mesmo que tenha sido observado que cada
500 genótipo apresentava um padrão específico de ativação do sistema antioxidante.
501 Estas ações contribuem para melhorar a eficiência na regulação e desintoxicação
502 de ROS produzidas naturalmente na célula vegetal, proporcionando maior
503 proteção contra danos oxidativo. Estes dados são consistentes com relatório
504 anteriores que demonstram que o aumento da atividade da SOD, induz atividade
505 aumentada das enzimas APX e CAT, que comandam a eliminação de H₂O₂
506 evitando grandes danos oxidativo à célula da planta (Mettler, 2002).

507 As enzimas APX e CAT têm diferentes afinidades para H₂O₂; a enzima APX
508 tem uma alta afinidade (uM) para esta ROS, enquanto a enzima CAT tem uma
509 baixa afinidade (mM) para a mesmo ROS (Mittler, 2002), mas o APX pode
510 eliminar H₂O₂ em cloroplastos e outros compartimentos celulares, inacessíveis à
511 CAT (Foyer e Noctor, 2011). No entanto, a enzima CAT é essencial para manter o
512 balanço redox durante a fotorrespiração intensa em plantas C3 (Willekens et al.,
513 1997).

514 A lentilha-d'água é uma planta C3 (Oukarroum et al., 2015), mas seu estilo de
515 vida aquático favorece a eficiência fotossintética, que suporta a alta taxa de
516 crescimento e conseqüentemente uma alta produtividade de biomassa potencial
517 para a indústria bioenergética (Muradov et al., 2010). Os resultados mostraram
518 baixos níveis de CAT para as condições avaliadas, mas em SH 0,5X a atividade
519 de CAT aumentou 6x e 5x nos clones CA e PA, respectivamente (Tabela 4), ao
520 mesmo tempo, esses clones apresentaram menor aumento de clorofila.

521 *3.3 Potencial do uso de lentilha-d'água para tratamento complementar de efluente*
522 *da ETE Mangueira*

523 A análise global dos parâmetros avaliados no meio SH 0,5X, utilizando o meio
524 SH 1X como referência, demonstrou a diversidade biológica dos clones de *L.*
525 *aequinoctialis*, o que pode influenciar seu potencial de aplicação para
526 fitorremediação de efluentes. Assim, os clones M2, RC e DI, clones foram
527 selecionados considerando a resposta de crescimento e a variação no teor de
528 amido induzidas no meio SH 0,5X, que influenciam o rendimento teórico para
529 produção de bioetanol. Por exemplo, M2 mostrou um aumento de cerca de 2x no
530 teor de amido, e apenas 17% de aumento na TCR; RC mostrou o maior aumento
531 (7,5x) no teor de amido e 57% de aumento na TCR; enquanto DI apresentou o
532 maior aumento de TCR (135%) e 40% no conteúdo de amido (Tabela 2). Estes
533 clones foram avaliados quanto à capacidade para fitorremediação de efluente da
534 estação de tratamento de esgoto doméstico em Mangueira, Recife-PE, através da
535 redução da demanda química de oxigênio (DQO), de nitrogênio total (NT), de
536 nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_4\text{-N}$) e de fósforo total (PT). A habilidade natural de
537 colonizar as águas residuais antropogênicas associada à capacidade de crescer
538 rapidamente e gerar grandes volumes de biomassa com potencial para bioenergia
539 devido ao seu alto teor de amido, com pouca ou nenhuma de lignina, torna a
540 lentilha-d'água uma matéria-prima muito relevante (Cui e Cheng, 2015).

541 A Tabela 5 apresenta a caracterização inicial do efluente coletado na lagoa de
542 polimento da ETE Mangueira, o qual atende as exigências legais para os
543 parâmetros avaliados. Foi observado que o nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_4\text{-N}$)
544 representava 97,3% de NT (Tabela 5), que inclui ainda as concentrações
545 residuais de nitrato e nitrito. A proporção de P:N do efluente tratado foi de 0,350
546 ou cerca de 3:1 (N:P). A caracterização afluente da ETE Mangueira (influyente
547 UASB) não foi obtida. No entanto, a DQO está próxima do valor médio detectado

548 por Silva et al. (2015), determinado a partir de 11 amostras coletadas em três
549 meses de monitoramento, enquanto que os valores médios de NT, NH₄-N e PT
550 foram menores que os detectados neste estudo.

551 A concentração residual e a eficiência de remoção/redução de DQO, NT, NH₄-
552 N e PT e o rendimento de biomassa (RB) dos clones M2, RC e DI cultivadas
553 durante 19 dias no efluente tratado são apresentados na Tabela 5. A eficiência de
554 redução da DQO variou de 85,5% a 94,8%; para NT, a eficiência variou de 36,3%
555 a 39,3%; entre 37,1% e 40,3% para a redução de NH₄-N; e, para PT, variou de
556 37,8% a 57,1%. Foi observado elevado rendimento em biomassa com média de
557 150 g.m⁻², representando ganho médio de 7.3 g.m⁻².d⁻¹ para biomassa.

558 Os resultados mostram que há manutenção da proporção de NH₄-N (96%) em
559 relação à NT, observada para três linhagens. A relação P:N observada nos clones
560 foi de 0,358 (M2), 0,282 (RC) e 0,236 (DI). O clone M2 apresentou menor
561 remoção de fósforo e maior remoção de nitrogênio, o que aumentou
562 discretamente a razão P:N. Curiosamente, o M2 mostrou RB mais baixo seguido
563 de RC e depois DI, comportamento semelhante foi observado para a razão P/N.
564 Em um estudo recente, observou-se que a variação da concentração de NT entre
565 1 a 5 mg.L⁻¹ não induziu significativamente o crescimento da lentilha-d'água
566 (Zhang et al., 2014), mas a relação fósforo e nitrogênio são parâmetros que
567 devem ser considerados nos estudos de modelagem do crescimento da lentilha-
568 d'água para a fitorremediação (Frédéric et al., 2006).

569 Estes dados demonstram que os clones M2, RC e DI de *L. aequinoctialis*
570 foram capazes de crescer eficientemente em efluente da ETE Mangueira,
571 contribuindo para redução/adequação da demanda química de oxigênio e das
572 concentrações de nitrogênio e fósforo total, produzindo quantidades relevantes de

573 biomassa, podendo agregar valores sociais, econômicos e ambientais aos
574 sistemas de tratamento de esgoto em operação.

575 **Tabela 5.** Caracterização do efluente da estação de tratamento de esgoto da Mangueira (Recife,
576 Brasil) antes e após 19 dias de cultivo de clones de *Lemna aequinoctialis* e apresentação do
577 rendimento em biomassa (RB).

Parâmetro	Efluente antes da lentilha-d'água	Efluente após crescimento de <i>L. aequinoctialis</i>		
		Clone M2	Clone RC	Clone DI
DQO (mg.L ⁻¹)	160	12,6	23,2	8,4
NT (mg.L ⁻¹)	44,6	27,1	27,7	28,4
NH ₄ -N (mg.L ⁻¹)	43,4	25,9	26,6	27,3
PT (mg.L ⁻¹)	15,6	9,7	7,8	6,7
RB (g.m ⁻²)	21,1*	154,6±19.2	155,2±31.1	169,6±64.2

578 *Densidade de inoculação

579 A capacidade de remover eficientemente nitrogênio e fósforo e reduzir
580 DQO/DBO das águas residuais domésticas e suínas têm sido relatada para
581 lentilhas-d'água (Priya et al, 2011; Xu e Shen, 2011; Mohedano et al., 2012a;
582 2012b). A aplicação potencial da lentilha-d'água, cultivada na água da lagoa de
583 polimento da ETE Mangueira, para tratamento posterior de águas residuais
584 domésticas foi demonstrada, contudo reconhecemos a necessidade de estudos
585 de modelagem em escala piloto antes da implantação do sistema *in loco*.

586 4. Conclusão

587 Neste trabalho é demonstrada a relevante diversidade biológica
588 intraespecífica de clones de *L. aequinoctialis* intimamente relacionados, isolados
589 na região metropolitana de Recife. Os clones apresentam baixa diversidade
590 genética para sequência *atpF-atpH*, contudo o cultivo *in vitro* permitiu, a partir da
591 avaliação de múltiplas características de interesse, demonstrar a plasticidade
592 fenotípica dos clones e selecionar adequadamente clones com potencial
593 biotecnológico de interesse, neste estudo, a capacidade para fitorremediação.

594 Portanto, a seleção de genótipos de lentilhas-d'água deve considerar a
595 diversidade biológica intraespecífica destas plantas, sendo o cultivo *in vitro* uma
596 alternativa compatível e economicamente viável. Visto que, a plasticidade
597 fenotípica de *L. aequinoctialis*, aqui demonstrada, parece estar associada a um
598 refinado controle molecular da regulação da expressão gênica.

599 **5. Agradecimentos**

600 Os autores agradecem aos patrocinadores: o Conselho Nacional de
601 Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq); a Financiadora de Estudos e
602 Projetos (FINEP); o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (INCT
603 Bioetanol) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
604 Pernambuco (FACEPE) para o apoio financeiro e bolsas de estudo; E a empresa
605 Lógica Ambiental Ltda. pela colaboração e pelas análises químicas de águas e
606 efluentes.

607 **6. Referências**

- 608 [1] Landolt E (1986) The family of Lemnaceae – a monographic study, Vol. 1.
609 Stiftung Rubel, Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der
610 Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zurich, Switzerland.
- 611 [2] Les DH, Landolt E and Crawford DJ (1997) Systematics of Lemnaceae:
612 inferences from micromolecular and morphological data. *Plant Systematics and*
613 *Evolution* 204:161–177.
- 614 [3] Landolt E (1998) *Lemna yungensis*, a new duckweed species from rocks of the
615 Andean Yungas in Bolivia. *Berichte des Geobotanischen Institutes der ETH,*
616 *Stiftung Rübel, in Zürich* 64:15–21.

- 617 [4] Les DH and Crawford DJ (1999) *Landoltia* (Lemnaceae), a new genus of
618 duckweeds. *Novon* 9: 530–533.
- 619 [5] Les DH, Crawford DJ, Landolt E et al (2002) Gabel JD, Kimball RT. Phylogeny
620 and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. *Systematic Botany* 27, 221–
621 240.
- 622 [6] Bog M, Baumbach H, Schween U et al (2010) Genetic structure of the genus
623 *Lemna* L. (Lemnaceae) as revealed by amplified fragment length polymorphism.
624 *Planta* 232(3):609-19.
- 625 [7] Zhao H, Appenroth K, Landesman L et al (2012) Duckweed rising at Chengdu:
626 summary of the 1st International Conference on Duckweed Application and
627 Research. *Plant Mol Biol* 78(6):627-32.
- 628 [8] Stomp AM (2005) The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing.
629 *Biotechnol Annu Rev* 11:69-99.
- 630 [9] Peng JF, Wang BZ, Song YH et al (2007) Modeling N transformation and
631 removal in a duckweed pond: Model application, *Ecological Modelling*
632 206(3;4)294-300.
- 633 [10] Cui W, Cheng JJ (2015) Growing duckweed for biofuel production: a review.
634 *Plant Biol (Stuttg)* 17 Suppl 1:16-23.
- 635 [11] Landolt E, Kandeler R (1987) Biosystematics investigation in the family of
636 duckweeds (Lemnaceae). The family of the Lemnaceae: a monographic study.
637 Vol. 2. Zurich: VeroffGeobotInst ETH.
- 638 [12] Xu JL, Cui WH, Cheng JJ et al (2011) Production of high-starch duckweed
639 and its conversion to bioethanol. *Biosyst Eng* 110:67-72.
- 640 [13] Xu J, Zhao H, Stomp AM et al (2012) The production of duckweed as a
641 source of biofuels. *Biofuels* 3(5)589-601.

- 642 [14] Chaudhary E, Sharma P (2014) Duckweed as ecofriendly tool for
643 phytoremediation. *Int J Sci Res* 3(6):1615-1617.
- 644 [15] Muradov N, Fidalgo B, Gujar AC, T-Raissi A (2010) Pyrolysis of fast-growing
645 aquatic biomass -*Lemna minor* (duckweed): Characterization of pyrolysis
646 products. *Bioresour Technol* 101(21):8424-8.
- 647 [16] Bezerra MG, França F (1999) Arales de lagoa em uma área do semi-árido
648 baiano. *Sitientibus*, Feira de Santana, 20:45-54.
- 649 [17] Xue H, Xiao Y, Jin Y, Li X, Fang Y, Zhao H, Zhao Y, Guan J (2012) Genetic
650 diversity and geographic differentiation analysis of duckweed using inter-simple
651 sequence repeat markers. *Mol Biol Rep* 39(1):547-54.
- 652 [18] Bergmann BA, Cheng J, Classen J, Stomp AM (2000) *In vitro* selection of
653 duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent
654 renovation. *Bioresour Technol* 73(1):13–20.
- 655 [19] Florencio L, Kato MT, de Moraes JC (2001) Domestic sewage treatment in full-
656 scale UASBB plant at Mangueira, Recife, Pernambuco. *Water Sci Technol*.
657 44(4):71-7.
- 658 [20] Silva RB, Gavazza S, Florencio L, Nascimento CWA, Kato MT (2015)
659 Cultivation of eucalyptus seedlings irrigated with treated domestic sewage. *Eng*
660 *Sanit Ambient* 20(2):323-330 DOI: 10.1590/S1413-41522015020000084883
- 661 [21] Conley DJ, Paerl HW, Howarth RW, Boesch DF, Seitzinger SP, Havens KE,
662 Lancelot C, Likens GE (2009) *Ecology*. Controlling eutrophication: nitrogen and
663 phosphorus. *Science* 303(5917):1014-1015.
- 664 [22] Steen P, Brenner A, Buuren J, Oron G (1999) Post-treatment of UASB reactor
665 effluent in an integrated duckweed and stabilization pond system. 33(3):615-620.

- 666 [23] Priya A, Avishek K, Pathak G (2012) Assessing the potentials of Lemna minor
667 in the treatment of domestic wastewater at pilot scale. *Environ Monit Assess*
668 184(7):4301-7.
- 669 [24] Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and
670 bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- 671 [25] Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and
672 growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot*
673 50:199–204.
- 674 [26] Doyle JJ, Doyle JL (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*
675 1:13-15.
- 676 [27] Borisjuk N, Chu P, Gutierrez R et al (2015) Assessment, validation and
677 deployment strategy of a two-barcode protocol for facile genotyping of duckweed
678 species. *Plant Biol (Stuttg)* 17 Suppl 1:42-9.
- 679 [28] Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor
680 and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- 681 [29] Tamura K, Stecher G, Peterson D et al (2013). MEGA6: Molecular
682 Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:
683 2725-2729.
- 684 [30] Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for
685 reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406-25.
- 686 [31] Ziegler P, Adelman K, Zimmer S et al (2015) Relative in vitro growth rates of
687 duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. *Plant Biol*
688 (Stuttg) 17 Suppl 1:33-41.

- 689 [32] Appenroth KJ, Krech K, Keresztes A et al (2010) Effects of nickel on the
690 chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their
691 possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere* 78(3):216-23.
- 692 [33] Wang W, Yang C, Tang X et al (2014) Effects of high ammonium level on
693 biomass accumulation of common duckweed *Lemna minor* L. *Environ Sci Pollut*
694 *Res Int.* 21(24):14202-10.
- 695 [34] Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ et al (1998) Response of antioxidant
696 enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in
697 leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley, *Physiol.*
698 *Plant.* 104:280–292.
- 699 [35] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of
700 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal*
701 *Biochem.* 7;72:248-54.
- 702 [36] Giannopolitis CN, Ries SK (1997) Superoxide Dismutases: I. Occurrence in
703 Higher Plants, *Plant Phys.* 59:309–314.
- 704 [37] Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate
705 specific peroxidase in spinach chloroplast, *Plant Cell Physiol.* 22:867-880.
- 706 [38] Haver EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization
707 of multiple forms of catalase in tobacco leaves, *Plant Phys.* 84:450-455.
- 708 [39] AMERICAN Public Health Association (2012) Standard Methods For The
709 Examination of Water and Wastewater. 22 ed. Washington.
- 710 [40] Silva FAS and Azevedo CAV (2006) A New Version of The Assistat-Statistical
711 Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN
712 AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais Orlando: American Society of
713 Agricultural and Biological Engineers, p.393-396.

- 714 [41] Wang W, Wu Y, Yan Y et al (2010) DNA barcoding of the Lemnaceae, a
715 family of aquatic monocots. *BMC Plant Biol* 16;10:205.
- 716 [42] Yu C, Sun C, Yu L et al (2014) Comparative analysis of duckweed cultivation
717 with sewage water and SH media for production of fuel ethanol. *PLoS One*.
718 17;9(12):e115023.
- 719 [43] Lam E, Appenroth KJ, Michael T et al (2014) Duckweed in bloom: the 2nd
720 International Conference on Duckweed Research and Applications heralds the
721 return of a plant model for plant biology. *Plant Mol Biol* 84(6):737-742.
- 722 [44] Xiao Y, Fang Y, Jin Y et al (2013) Culturing duckweed in the field for starch
723 accumulation. *Industrial Crops and Products* 48;183-190.
- 724 [45] Tao X, Fang Y, Xiao Y et al. (2013) Comparative transcriptome analysis to
725 investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under
726 nutrient starvation. *Biotechnol Biofuels*. 8;6(1):72.
- 727 [46] Zhao Z, Shi HJ, Wang ML et al. (2015) Effect of nitrogen and phosphorus
728 deficiency on transcriptional regulation of genes encoding key enzymes of starch
729 metabolism in duckweed (*Landoltia punctata*). *Plant Physiol Biochem*. 86:72-81.
- 730 [47] Yin Y, Yu C, Yu L et al. (2015) The influence of light intensity and photoperiod
731 on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production.
732 *Bioresour Technol*. 187:84-90.
- 733 [48] Sree KS, Adelman K, Garcia C et al. (2015) Natural variance in salt
734 tolerance and induction of starch accumulation in duckweeds. *Planta*.
735 241(6):1395-404.
- 736 [49] Rival S, Wisniewski JP, Langlais A et al (2008) *Spirodela* (duckweed) as an
737 alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin.
738 *Transgenic Res* 17(4):503-513.

- 739 [50] Vunsh R, Li J, Hanania U et al (2007) High expression of transgene protein in
740 *Spirodela*. Plant Cell Rep. 26(9):1511-1519.
- 741 [51] Scheer H (2008) Chlorophylls and Carotenoids, Chemistry of. Wiley
742 Encyclopedia of Chemical Biology 1-11.
- 743 [52] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Biochemistry. 5th edition. New York:
744 W H Freeman. Section 19.5, Accessory Pigments Funnel Energy Into Reaction
745 Centers. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22604/>
- 746 [53] Costache MA, Campeanu G, Neata G (2012) Studies concerning the
747 extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. Romanian Biotech.
748 Lett 17(5): 7702-08.
- 749 [54] Suzuki W, Sugawara M, Miwa K et al (2014) Plant growth-promoting
750 bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of
751 the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). J
752 Biosci Bioeng 118(1):41-4.
- 753 [55] You J, Chan Z (2015) ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in
754 Crop Plants. Front Plant Sci 8;6:1092.
- 755 [56] Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery
756 in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem 48(12):909-30.
- 757 [57] Caverzan A, Passaia G, Rosa SB et al (2012) Plant responses to stresses:
758 Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Genet Mol Biol
759 35(4):1011-9.
- 760 [58] Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends
761 Plant Sci 7(9):405-10.
- 762 [59] Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox
763 hub. Plant Physiol 155(1):2-18.

- 764 [60] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M et al (1997) Catalase is a sink for
765 H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. EMBO J
766 15;16(16):4806-16.
- 767 [61] Oukarroum A, Bussotti F, Goltsev V et al (2015) Correlation between reactive
768 oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna*
769 *gibba* L. plants under salt stress. Environ Exp Bot 109:80-88.
- 770 [62] Zhang K, Chen YP, Zhang TT et al (2014) The logistic growth of duckweed
771 (*Lemna minor*) and kinetics of ammonium uptake. Environ Technol 35(5-8):562-7.
- 772 [63] Frédéric M, Samir L, Louise M et al (2006) Comprehensive modeling of mat
773 density effect on duckweed (*Lemna minor*) growth under controlled eutrophication.
774 Water Res 40(15):2901-10.
- 775 [64] Xu J, Shen G (2011) Growing duckweed in swine wastewater for nutrient
776 recovery and biomass production. Bioresour Technol 102(2):848-53.
- 777 [65] Mohedano RA, Costa RH, Tavares FA et al (2012) High nutrient removal rate
778 from swine wastes and protein biomass production by full-scale duckweed ponds.
779 Bioresour Technol 112:98-104.
- 780 [66] Mohedano RA, Velho VF, Costa RH et al (2012b) Nutrient recovery from
781 swine waste and protein biomass production using duckweed ponds (*Landoltia*
782 *punctata*): southern Brazil. Water Sci Technol. 65(11):2042-8.

5 CAPITULO II

Proteômica diferencial associada ao crescimento de *Lemna aequinoctialis* L.
cultivada em presença de efluente sanitário²

Autores:

Adauto Gomes Barbosa Neto¹, Marciana Bizerra de Moraes² e Tercilio Calsa Junior^{1,2}.

Filiação:

¹Programa de Pós-Graduação em Genética, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, RENORBIO, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

² Artigo a ser submetido para publicação no periódico “*Bioresource technology*”, ISSN: 0960-8524, fator de impacto: 4.917, qualis A1 em CB1.

1 **Proteômica diferencial associada ao crescimento de *Lemna aequinoctialis* L.**
2 **cultivada em presença de efluente sanitário**

3 Aauto Gomes Barbosa Neto¹, Marciana Bizerra de Morais¹ e Tercilio Calsa
4 Junior¹.

5 ¹. Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética,
6 Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE,

7 **Resumo**

8 *Lemna aequinoctialis* é membro da família Lemnaceae, que agrupa as
9 menores angiospermas conhecidas. Popularmente conhecida com lentilhas-
10 d'água, estas macrófitas aquáticas têm se destacado para pesquisa de biologia e
11 biotecnologia vegetal, em especial, como matéria-prima para bioenergia e para o
12 tratamento de águas residuais. Neste estudo, foi avaliada a influência da adição
13 de água de esgoto (SW) ao meio Schenk & Hildebrandt (SH) no crescimento, no
14 metabolismo e no proteoma de uma *L. aequinoctialis* nativa (clone M1). Adição de
15 SW em SH (SH:SW) melhorou o crescimento da lentilha-d'água, que incrementou
16 o ganho de biomassa fresca em até 70 vezes. O teor de amido variou de 2,2% a
17 28,3%. O teor de clorofilas e carotenoides foi influenciado pelo tempo de cultivo.
18 O padrão de atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato
19 peroxidase (APX) e Catalase (CAT) e do acúmulo de peróxido hidrogênio (H₂O₂)
20 mostrou o estabelecimento de estresse oxidativo, exceto para *L. aequinoctialis* M1
21 cultivada em SH:SW. A análise das proteínas diferencialmente acumuladas
22 apontou para modulação da fotorrespiração, do metabolismo de hormônios, de
23 respostas à estresses e de vias de transdução de sinal como os principais

24 mecanismos moleculares associados à adaptação de *L. aequinoctialis* M1 para
25 colonizar águas residuais.

26 **Palavras-chave:** fitorremediação, proteômica, tratamento de efluentes, amido

27 **1. Introdução**

28 Lentilhas-d'água têm sido amplamente investigadas na biologia e
29 biotecnologia vegetal. Estas pequenas macrófitas aquáticas apresentam
30 crescimento rápido e clonal que, associado ao elevado teor de amido, estimulam
31 o desenvolvimento de estudos e pesquisas para exploração do potencial
32 biotecnológico (Zhao et al., 2012; Lam et al., 2014). Dentre os potenciais de
33 aplicação, as lentilhas-d'água se destacam como cultura para bioenergia (Cui e
34 Cheng, 2015), para bioprodução (Stomp, 2005) e para tratamento de efluentes
35 urbanos e rurais (Kuraishi e Sharma, 2011).

36 A produção de biomassa de lentilhas-d'água é capaz de superar a maioria
37 das culturas terrestres, apresentando menor tempo de duplicação de biomassa
38 (Muradov et al., 2010). Contudo, a necessidade da seleção de lentilhas-d'água
39 com produção de biomassa e taxa de crescimento, a partir de águas residuais,
40 similares às obtidas a partir de meio de cultivos, é cada vez mais evidenciada (Yu
41 et al., 2014). Quando isto for alcançado, o cultivo de lentilhas-d'água em larga
42 escala a partir de águas residuais poderá agregar valor e mais benefícios
43 ecológicos e ambientais aos sistemas convencionais de tratamento de esgoto
44 (Kuraishi e Sharma, 2011), tornando-o sua implementação mais rentável e
45 economicamente sustentável, contribuindo e estimulando a ampliação e
46 prestação deste serviço público em países em desenvolvimento.

47 Neste contexto, pesquisas com objetivo de identificar biomarcadores
48 funcionais associados ao maior crescimento e adaptação de lentilhas-d'água em
49 águas residuais são de grande importância. Neste estudo, avaliou-se a influência
50 da adição de água de esgoto (SW) ao meio de cultivo SH (Schenk e Hildebrandt,
51 1972) na taxa de crescimento, no rendimento em biomassa, na atividade
52 antioxidativas e na capacidade de remoção de nitrogênio e fósforo de *L.*
53 *aequinoctialis* clone M1. Além disso, a expressão gênica, em nível traducional, de
54 *L. aequinoctialis* clone M1 foi avaliada a partir da técnica de eletroforese
55 bidimensional (2D-PAGE).

56 **2. Material e Métodos**

57 2.1 Composição dos meios de cultivo

58 Foram coletados 20 L de efluente na saída da lagoa de polimento, última
59 etapa de tratamento da estação de tratamento de esgotos (ETE) da Mangueira,
60 Recife-PE. A amostra foi armazenada e transportada em um único galão para
61 garantir a homogeneidade da amostra. No laboratório o efluente foi autoclavado a
62 120 °C, 1 ATM por 20 min, e após arrefecimento a temperatura ambiente, 2 L foi
63 encaminhado à empresa Lógica ambiental para determinação da concentração de
64 nitrogênio total (NT), nitrogênio amoniacal (NH₄-N) e fósforo total (PT), de acordo
65 com os métodos SMEWW 5220 D e 4500 (APHA, 2012). Paralelamente, foi
66 preparado meio SH 1X (Schenk e Hildebrandt, 1972), pH 5,8, suplementado com
67 sacarose 10,0 g.L⁻¹ e mio-inositol 1,0 g.L⁻¹.

68 Foram preparados três meios:

- 69 • SH 0,5X: mistura de uma parte de meio SH 1X e uma parte de H₂O
70 destilada autoclavada, pH 5,8;

71 • SH:SW: mistura de uma parte de meio SH 1X e uma parte de efluente
72 autoclavado, pH 7,1;

73 • SW: apenas o efluente autoclavado, pH 7,2.

74 Após autoclavagem, SW continha 44,6 mg.L⁻¹ de NT, 43,4 mg.L⁻¹ de NH₄-N e
75 15,6 mg.L⁻¹ de PT.

76 Foram distribuídos 50 mL dos meios de cultura em frascos de polycarbonato
77 para micropropagação (Ralm, ref. FC 001-2011) com capacidade para 250 mL,
78 gerando uma lâmina d'água com 2,5 cm de profundidade e 35 cm² de área.

79 2.2 Clone e condições de cultivo

80 Para os ensaios foi selecionado o clone *L. aequinoctialis* M1, coletado em
81 lagoa de polimento da ETE Mangueira, Recife-PE, que, de acordo com ensaios *ex*
82 e *in vitro*, realizados no laboratório, apresentou rápida taxa crescimento e
83 produção de biomassa a partir de meios de cultivos (*in vitro*) e água de esgoto (*ex*
84 *vitro*) (Dados não mostrados). Para os ensaios de crescimento e produção de
85 biomassa, foram inoculados 90 mg de plantas fresca e saudáveis (40-50 frondes),
86 representando a densidade de inoculação igual a 25,5 g de lentilha-d'água fresca
87 por metro quadrado (g.m⁻²).

88 O experimento foi conduzido por 21 dias em câmara climática, modelo SL-
89 205/1370/SOLAB, garantindo uniformidade ambiental: 25±2 °C; 16/8 h
90 claro/escuro; 60% umidade; 80 μmol.m⁻².s⁻¹ luminosidade.

91 2.3 Crescimento, produção de biomassa, teor de amido e rendimento em bioetanol

92 A taxa de crescimento relativo (TCR), obtida a partir do valor de logaritmo
93 neperiano (ln) do tempo final (x_{t1}) e do tempo inicial (x_{t0}) em dias (Equação 1) e o
94 tempo de duplicação (TD), que considera o valor de logaritmo neperiano de dois

95 (ln2) e o valor de TCR (Equação 2) foram calculadas a partir do peso fresco e do
96 número de frondes usando a equação simplificada para dois pontos, inicial (0 dia)
97 e final (10 dias), conforme descrito por Ziegler et al. (2015):

$$98 \quad \text{TCR} = (\ln x_{t1} - \ln x_{t0}) / (t1 - t0) \quad [1]$$

$$99 \quad \text{TD} = \ln 2 / \text{TCR} \quad [2]$$

100 O rendimento em biomassa ($\text{RB} = \text{g} \cdot \text{m}^{-2}$) foi estimado a partir do ganho real
101 de biomassa em peso fresco, considerando a área superficial de crescimento de
102 $0,003524 \text{ m}^2$. Os parâmetros de crescimento e produção de biomassa foram
103 monitorados por 21 dias, com coletas após 24 h, 3, 6, 10, 15 e 21 dias.

104 O teor de amido foi monitorado após 24 h, 3, 6, 10, 15 e 21 dias do início do
105 experimento. O teor de amido foi determinado por método colorimétrico descrito
106 por Appenroth et al. (2010). Resumidamente, o material vegetal foi macerado em
107 solução HCl 18% (p/v), incubado a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h sob agitação constante. Em
108 seguida o homogeneizado foi centrifugado a 5000 xg por 20 min. Uma alíquota do
109 sobrenadante foi adicionada de igual volume de solução de Lugol (0.5% KI p/v e I_2
110 0.25% p/v em H_2O) para determinação da absorbância a 530 and 605 nm. Os
111 valores obtidos foram aplicados nas equações descritas para determinação do
112 teor de amido.

113 A partir dos dados de rendimento em biomassa e teor de amido foi calculado
114 o rendimento teórico em bioetanol, considerando as eficiências de hidrólise e de
115 fermentação descritas por Xu et al. (2012) para biomassa de lentilha-d'água.

116 2.4 Pigmentos fotossintetizantes

117 O teor de clorofila a, b e total e de carotenoides foi determinado pelo método
118 de extração em acetona 80% descrito por Wang et al. (2014). Resumidamente, as
119 plantas foram maceradas na solução de acetona 80%, em seguida centrifugada a
120 1.500 xg por 5 min e o sobrenadante foi recuperado para determinação da
121 absorvância a 663, 645 e 470 nm. Os valores de absorvância foram utilizados
122 para calcular a concentração dos pigmentos.

123 2.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio e ensaio de atividade antioxidante

124 2.5.1 Quantificação de peróxido de hidrogênio

125 O teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi quantificado de acordo com
126 protocolo descrito por Alexieva et al. (2001). Amostras foram trituradas com ácido
127 tricloroacético (TCA) 0,1% na proporção de 1 g para 10 mL (p/v) e centrifugadas a
128 10.000xg durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante (200 µL) foi transferido para
129 novo tubo e adicionado por 200 µL de tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH
130 7,5) e 800 µL de iodeto de potássio 1 M. As amostras foram mantidas em banho
131 de gelo e na ausência de luz por 1 h. Após esse período, foram removidos do gelo
132 e mantidos à temperatura ambiente para estabilização da reação, seguido por
133 leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

134 2.5.2 Atividade específica de SOD, APX e CAT

135 As amostras congeladas em N₂ líquido foram maceradas e homogeneizadas
136 em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5; 1 mM EDTA; 3 mM DTT e 20%
137 PVPP, gelado, na proporção de 1 g de planta para 3 mL de tampão (p/v). O
138 extrato foi centrifugado a 10.000 xg, 4 °C por 30 min para recuperação do
139 sobrenadante, que foi estocado a -20 °C até os ensaios de atividade enzimática

140 (Azevedo et al., 1998). O teor de proteínas totais solúveis foi determinado pelo
141 método de Bradford (1976).

142 A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi
143 mensurada pela inibição da redução fotoquímica de nitroazul de tetrazólio (NBT)
144 em 3 mL de solução de reação (tampão fosfato 85 mM, pH 7,8, 75 μ M NBT; 3 μ M
145 riboflavin; 13 mM metionina; 0,1 mM EDTA) e 50 μ l do extrato enzimático. A
146 solução foi incubada sob luz branca por 5 min, em seguida foi obtido o valor de
147 absorvância a 560 nm. Os valores de atividade serão expressos em U SOD.mg⁻¹
148 proteína (Giannopolitis e Ries, 1977).

149 A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi
150 mensurada a partir do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato. O ensaio
151 enzimático foi realizado em 650 μ L de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5,
152 100 μ L de ascorbato 5 mM, 100 μ L de EDTA 100 mM, 100 μ L de H₂O₂ 1 mM e 50
153 μ L do extrato enzimático. Após 60 s de reação a 30 °C o valor de absorvância a
154 290 nm foi obtido (Nakano e Asada, 1981).

155 A atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pela
156 decomposição de H₂O₂ em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH
157 7,5, e 60 μ L de H₂O₂ 0,1 M. A reação é iniciada após a adição de 50 μ L do extrato
158 enzimático, após 60 s de reação, foi obtida o valor Δ da absorvância a 240 nm a
159 25 °C (Havir e Mchale, 1987). A atividade específica de APX e CAT foi expressa
160 em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína.

161 2.6 Análise proteômica

162 2.6.1 Extração de proteínas e quantificação

163 A análise proteômica foi procedida com amostras de SH e SH:SW do 6º dia
164 de experimento, considerando que *L. aequinoctialis* M1 já se encontrava

165 aclimatada aos meios de cultivo, para permitir a análise de respostas associadas
166 ao crescimento nos meios avaliados. As proteínas totais foram extraídas, a partir
167 de 1 g de frondes de *L. aequinoctialis* M1, pelo método fenol (Hurkman e Tanaka,
168 1986) com modificações. Resumidamente, o material vegetal, após breve
169 secagem em papel toalha, foi congelado em N₂ líquido e macerado, em seguida,
170 homogeneizado em tampão de extração (Tris-HCl 500 mM, pH 7,5; Sacarose 0,7
171 M; KCl 0,1 M; EDTA 50 mM; PMSF 2 mM; β-mercaptoetanol 2%) e mantidos sob
172 agitação constante (70 rpm) por 30 min em banho de gelo. Após incubação,
173 adicionou-se fenol saturado em Tris-HCL (pH 8,5) incubando-se novamente a 70
174 rpm em banho de gelo por 30 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a
175 7.197 xg por 50 min a 4 °C, para recuperação do sobrenadante. As proteínas
176 foram precipitadas *overnight* a 4 °C em solução de acetato de amônio 100 mM em
177 metanol, gelada. Em seguida, foi centrifugada a 7.197 xg , 4 ° C, durante 1 h. O
178 precipitado de proteína foi lavado uma vez com solução de acetato de amônio 100
179 mM em metanol gelado, uma vez em metanol gelado e por duas vezes em
180 solução de acetona 80% gelada. Após a secagem, o sedimento foi solubilizado
181 em 600 µL de tampão ureia/tioureia (7M:2M). A quantificação da proteína foi
182 realizada com o método de Bradford (1976), com azul de Coomassie, com a curva
183 padrão de albumina sérica bovina (BSA). Integridade das proteínas foi verificada
184 em SDS-PAGE em gel a 12%.

185 2.6.2 2D-PAGE

186 Focalização isoeétrica (IEF) foi realizada na plataforma Ettan IPGphor 3 (GE
187 Healthcare Life Sciences), utilizando tiras de 13 cm e gradiente de pH 3-10
188 imobilizado, reidratadas com 250 µg de proteínas dissolvidas em solução de
189 reidratação (ureia 7M, tioureia 2M, CHAPS 2%, DTT 2 mM, tampão IPG pH 3-10

190 1,0% (GE Healthcare Life Sciences) e 0,005% de azul de bromofenol). IEF foi
191 realizada a 15 °C em cinco etapas: i) 200 V – 150 V.h⁻¹; ii) 500 V – 500 V.h⁻¹ ; iii)
192 1.000 V – 1.000 V.h⁻¹ em gradiente; iv) 8.000 V – 14.500 V.h⁻¹ em gradiente; e, v)
193 8.000 V – 4.550 V.h⁻¹ com corrente (50 µA por tira). Após focalização as tiras
194 foram armazenadas -80 °C. Para eletroforese, as proteínas foram submetidas a
195 duas etapas consecutivas: redução, as tiras foram submergidas em solução de
196 equilíbrio (50 mM Tris-HCl, pH 8,8; ureia 6 M; glicerol 30%; SDS 2%) contendo
197 ditioneitol (DTT) 1%; e, alquilação, utilizando solução de equilíbrio contendo
198 iodoacetamida (IAA) 2,5%. Após equilíbrio das fitas, a eletroforese foi realizada
199 em gel 12,5% (20x20 cm), a 15 ° C em duas etapas: i) 300 V em gradiente, 15 mA
200 e 30 W durante 20 min; e ii) 300 V, 30 mA e 30 W por até 2 h. Géis 2D-PAGE
201 foram corados com solução contendo 0,01 g.L⁻¹ *Coomassie Brilliant Blue G-250*
202 conforme descrito por Candiano et al. (2004).

203 2.6.3 Análise de imagens e seleção de *spots* diferenciais

204 Imagens dos géis 2D-PAGE foram obtidas pela digitalização de géis no
205 ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) com o programa LabScan 6.0
206 (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com recomendações do fabricante. As
207 imagens digitalizadas foram analisadas com o software ImageMaster 2D Platinum
208 v7.05 (GE Healthcare Life Sciences), admitindo SH como referência.
209 Interferências foram manualmente minimizadas e os *spots* que apresentaram
210 razão de variação da porcentagem de volume (%Vol.), denominada de *ratio*, $\geq 1,5$
211 para e ANOVA significativa ($p \leq 0,05$), por algoritmo próprio do software, foram
212 selecionados como diferencialmente acumulados.

213 2.6.4 Identificação de *spots* diferenciais por espectrometria

214 Os *spots* diferencialmente acumulados foram manualmente excisados a partir
215 do gel mais intenso, seguida de digestão *in gel* utilizando tripsina de acordo com o
216 protocolo descrito por Shevchenko et al. (2006). Os peptídeos foram extraídos em
217 solução contendo ácido trifluoroacético (TFA) 5% e acetonitrila 50%, os quais
218 foram concentrados em rotoevaporador a vácuo e armazenado a 20 °C até
219 análise MS.

220 Para análise MALDI-ToF MS, os peptídeos foram solubilizados em 10 µL de
221 solução TFA 0,1%, em seguida, foram misturados na proporção 1:1 com solução
222 de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico 1%; acetonitrila 50%; TFA 0,3%) e
223 colocados numa placa MTP 384 *target* (Bruker Daltonics). A placa foi incubada à
224 temperatura ambiente até secagem das amostras e completa cristalização da
225 matriz. Os espectros MS e MS/MS foram adquiridos no Autoflex III MALDI-ToF
226 (Bruker Daltonics) no modo manual através do software FlexControl™ (Bruker
227 Daltonics). Os parâmetros foram ajustados para o modo de reflexão iônica
228 positiva com uma tensão de aceleração de 20 kV, admitindo: taxa de disparo de
229 100 Hz; faixa de massas de 700,0–5.000,0 Da; intensidade de laser 25-50%;
230 2.100-4.000 disparos acumulados por espectro. O equipamento foi calibrado
231 utilizando uma mistura peptídica $[M + H]^+$ íons para calibração padrão de MALDI-
232 ToF/MS. Os arquivos *peaklist.xml* foram gerados a partir do programa
233 FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics). A identificação das proteínas foi realizada
234 utilizando-se a plataforma Mascot usando banco de dados local composto por
235 sequências de proteínas de *Lemnaceae* obtidos a partir de UniProt
236 (<http://www.uniprot.org>). Quando não identificados no Mascot local, a identificação
237 foi realizada nas plataformas Mascot *opensource* (<http://www.matrixscience.com/>):
238 *Peptide Mass Fingerprint*, para dados MS; ou *MS/MS Ions Search*, para dados

239 MS/MS; a partir de banco de dados de sequências para *Viridiplantae*. Apenas
240 proteínas com $e\text{-value} \leq 0,05$ foram consideradas identificação positiva.

241 2.7 Análise de ontologia gênica

242 Para análise de ontologia gênica (GO), as sequências de aminoácidos das
243 proteínas diferencialmente acumuladas foram recuperadas, no formato
244 MULTIFASTA, na base de dados UniProtBETA
245 (<http://beta.uniprot.org/uploadlists/>). A sequência FASTA dos acessos únicos do
246 NCBI foi recuperada a partir do banco de dados nr (não redundantes) e inseridos
247 manualmente no arquivo MULTIFASTA. Este arquivo foi utilizado para
248 mapeamento de termos de GO para processo biológico no Mercator
249 (<http://www.plabipd.de/portal/mercator-sequence->).

250 2.8 Análises estatísticas

251 Os resultados quantitativos do bioensaio são representados pela média de
252 triplicatas com seu desvio padrão, considerando delineamento experimental
253 inteiramente casualizado, com tratamentos em esquema fatorial 3x5, sendo três
254 condições de meio de cultivo (SH, SH:SW e SW) e seis tempos (1, 3, 6, 10, 15 e
255 21), considerado como tratamentos quantitativos. Os dados foram submetidos à
256 análise de variância (ANOVA), pelo teste F, e às médias comparadas pelo teste
257 de Tukey a 1% e 5% de significância, com exceção do tempo, ao qual o teste de
258 comparação de média não se aplica, sendo realizada a análise de regressão
259 polinomial, para verificação de adequação dos resultados experimentais aos
260 modelos linear, quadrático e cúbico, com observação do valor do coeficiente de
261 determinação R^2 , em função do tempo, utilizando o programa estatístico Assistat
262 7.7 beta (Azevedo e Silva, 2006).

263 3. Resultados e Discussão

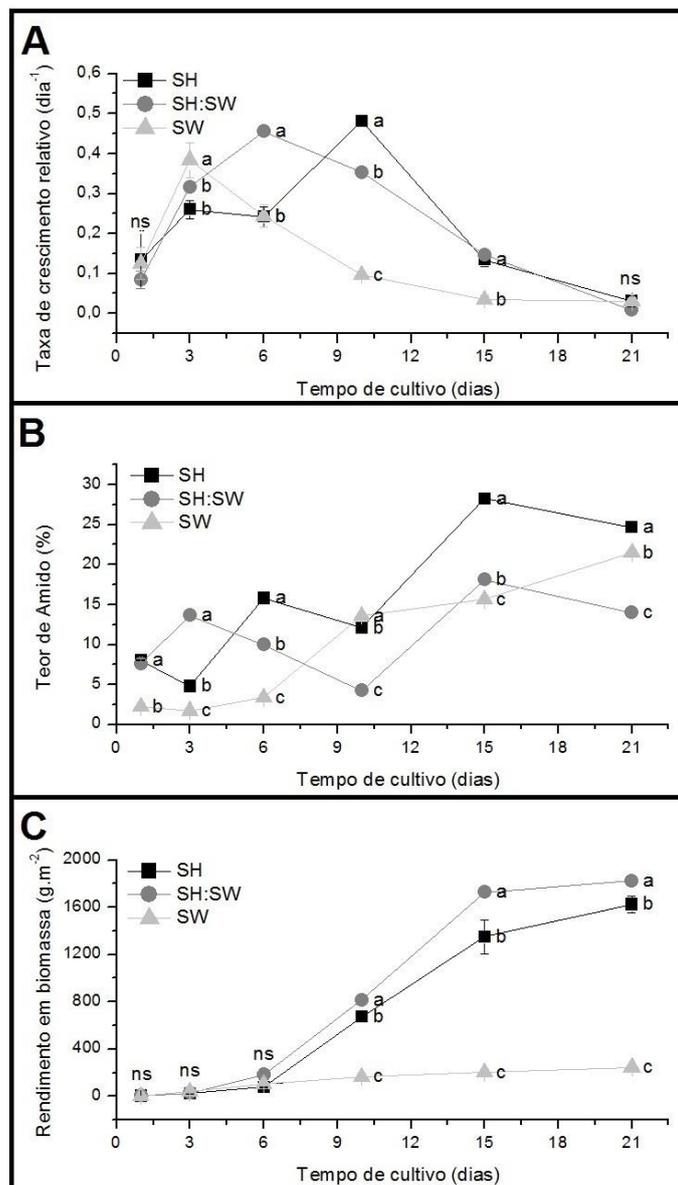
264 3.1 Crescimento, teor de amido, produção de biomassa de *L. aequinoctialis* clone 265 M1

266 *L. aequinoctialis* M1 foi capaz de crescer por três semanas (21 dias) nos
267 meios: SH 0,5X, aqui representado genericamente por SH; no meio SH:SW; e no
268 efluente (SW). O meio SH 0,5X foi admitido como controle, pois este meio é
269 capaz de induzir o crescimento de clones de *L. aequinoctialis* (manuscrito em
270 preparação). A análise conjunta destas condições permite avaliar as respostas
271 distintas de SH e SW e a resposta isolada da contribuição do efluente em SH:SW.
272 *Lemna* possui ampla faixa de pH ótimo com capacidade de manutenção do
273 crescimento (Mkandawire e Dudel, 2007), portanto, a variação de pH entre os
274 meios de cultivo utilizados, parece não ter interferido no crescimento e
275 desenvolvimento de *L. aequinoctialis* M1.

276 O crescimento rápido e clonal, associado ao elevado teor de amido exibido
277 pelas lentilhas-d'água são, sem dúvida, as principais características que
278 impulsionam estudos e pesquisas para exploração do potencial biotecnológico
279 destas relevantes plantas (Zhao et al., 2012; Lam et al., 2014). O monitoramento
280 do crescimento, da produção de biomassa e do teor de amido (%) de *L.*
281 *aequinoctialis* M1 durante 21 dias de cultivo *in vitro* é apresentado na Figura 1.

282 A taxa de crescimento relativo (TCR) representa o incremento real de
283 crescimento entre os momentos de coleta, o que permite a observação da fase
284 exponencial e do esgotamento de crescimento. No 1º e no 21º dia não foi
285 observada diferença significativa para TCR entre os meios avaliados, o que
286 possivelmente está associado à aclimatação do clone e ao esgotamento da
287 capacidade de crescimento, respectivamente. *L. aequinoctialis* M1 apresentou

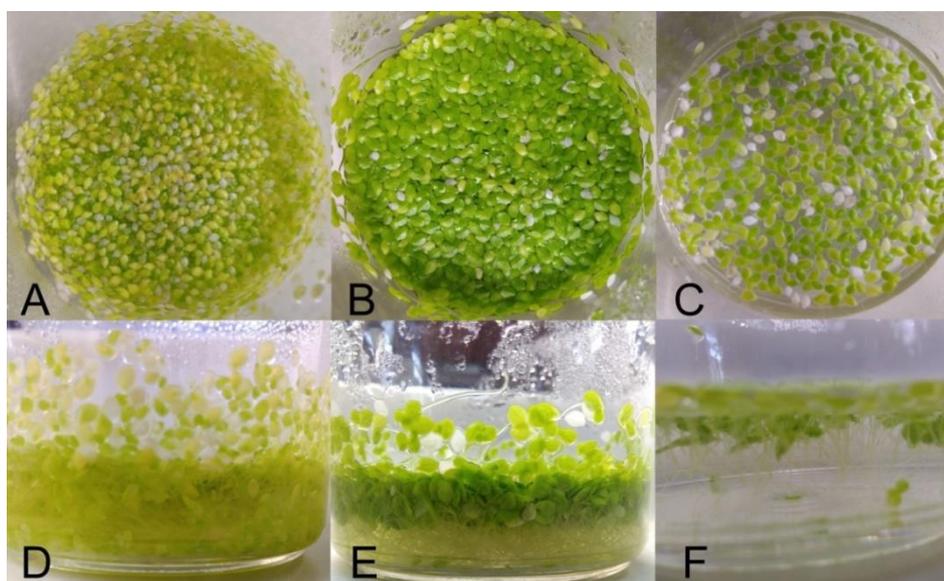
288 máximo crescimento em tempos distintos para cada meio, entre o 1º e o 3º dia
 289 para SW, entre o 3º e o 6º dia para SH:SW e entre o 6º dia e o 10º dia para SH,
 290 atingindo TCR de 0,38, 0,46 e 0,48, respectivamente (Figura 1A).



291 **Figura 1.** Monitoramento do crescimento, do teor de amido e da produção de biomassa de *Lemna*
 292 *aequinoctialis* clone M1 cultivada em SH (controle), em SH:SW e em SW durante 21 dias. A) Taxa
 293 de crescimento relativo (dia⁻¹); B) Teor de amido (%); C) Rendimento de biomassa (g.m⁻²). As
 294 letras representam a diferença de médias entre os meios, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
 295 Enquanto ns (não significativo) representa que não houve diferença significativa entre as médias.
 296

297 Na condição SH, *L. aequinoctialis* M1, exibiu a maior TCR, mas o clone
 298 atingiu TCR muito aproximada em SH:SW já no 6º dia de experimento,

299 demonstrando que, de fato, o meio SH, base destes dois meios, é um meio de
300 cultura otimizado para o cultivo de lentilhas-d'água, fornecendo concentrações
301 ideais de nutrientes (Yu et al., 2014). No entanto, SH 0,5X parece não suportar o
302 crescimento de *L. aequinoctialis* M1 para além de 21 dias de experimento, quando
303 as plantas se apresentavam debilitadas (Figura S1A e S1D). Resultados
304 anteriores demonstraram que este meio é capaz de induzir o incremento do
305 crescimento e, conseqüentemente, da produção de biomassa no cultivo *in vitro*
306 em comparação com o meio completo (SH 1X), estimulando a biossíntese de
307 pigmentos fotossintetizantes e modulando a atividade das enzimas SOD, APX e
308 CAT do sistema antioxidante, mostrando-se adequado para seleção de genótipos
309 a partir da avaliação de múltiplos critérios fenotípicos (manuscrito em
310 preparação).



311
312 **Figura suplementar S1.** Aspecto das frondes de *Lemna aequinoctialis* clone M1 após 21 dias de
313 cultivo em meio SH (A e D), SH:SW (B e E) e SW (C e F).

314 Surpreendentemente, em SH:SW as plantas apresentavam-se aparentemente
315 saudáveis ainda no 21º dia, onde, assim como em SH, havia sobreposição de
316 plantas devido a limitação de área de crescimento (Figura S1B e S1E), indicando

317 que de alguma forma a adição de efluente foi capaz de otimizar o crescimento de
318 da lentilha-d'água. Estes problemas não foram observados em SW que reduziu
319 drasticamente a TCR a partir do 3º dia (Figura 1), mas devido manutenção da
320 plantas e do baixo crescimento, *L. aequinoctialis* M1 foi capaz de manter-se até o
321 21º dia, apresentando poucas plantas com clorose (Figura S1C e S1F).

322 O comportamento de crescimento observado influenciou fortemente a
323 produção e/ou o acúmulo de amido, sendo observadas respostas
324 diferencialmente significativas entre os meios desde o 1º até o 21º dia (Figura 1B).
325 Em SW, o acúmulo de amido foi progressivamente induzido logo após redução da
326 TCR (3º dia), atingindo 21,5% de amido no 21º dia (Figura 1). Enquanto SH:SW e
327 SH atingiram 18,1% e 28,3% de teor de amido, respectivamente, ao 15º dia de
328 experimento, mas nestas condições o acúmulo de amido não demonstrou padrão
329 de acúmulo, especialmente em SH:SW, indicando, possivelmente, que o amido
330 ainda possuía papel ativo no metabolismo. O amido é sintetizado nos cloroplastos
331 durante a fotossíntese, utilizando como substrato a ADP-glicose derivada a partir
332 do ciclo de Calvin-Benson, mas na ausência de luz, principalmente, e para
333 balanceamento metabólico, este amido é degradado para liberação de maltose e
334 glicose, principalmente, utilizadas para manutenção do metabolismo heterotrófico
335 da planta (Stitt e Zeeman, 2012).

336 A produção de biomassa de lentilhas-d'água é capaz de superar a maioria
337 das culturas terrestres (Muradov et al., 2010). *L. aequinoctialis* M1 foi capaz de
338 acumular cerca de 1.600 g.m⁻² para SH, 1.900 g.m⁻² para SH:SW e 240 g.m⁻² para
339 SW em biomassa fresca (Figura 1C). Teoricamente, a partir da densidade de
340 inóculo (25,5 g.m⁻²), o ganho de biomassa representaria até 65, 70 e 10 vezes
341 para SH, SH:SW e SW, respectivamente. O ciclo de crescimento de *L.*

342 *aequinoctialis* M1 foi de 15 dias para SH e SH:SW, no qual atingiu taxa de
343 incremento máximo em biomassa de 90 e 115 g.m⁻².dia⁻¹ em peso fresco,
344 respectivamente. No entanto, em SW o ciclo de crescimento do clone foi de 10
345 dias, atingindo a taxa de incremento máximo em biomassa de 16 g.m⁻².dia⁻¹. Em
346 um estudo similar, Yu et al. (2014) compararam o crescimento, o teor de amido e
347 a produção de biomassa de *L. aequinoctialis* clone 6000 cultivada em meio SH 1X
348 e em água de esgoto diluída em água na proporção 1:1, atingindo biomassa
349 máxima de 150 g.m⁻² para o meio SH 1X após 24 dias e 77 g.m⁻² para água de
350 esgoto após 18 dias.

351 A Tabela 1 apresenta as equações ajustadas e seus respectivos coeficientes
352 de determinação (R²) e de variância (C.V.%) obtidos a partir da análise de
353 regressão. Os parâmetros de TCR, Amido e RB apresentaram interação com
354 tempo de cultivo para os meios avaliados. A TCR de *L. aequinoctialis* M1 variou
355 em função do tempo com ajuste polinomial de segundo grau para equação de
356 regressão, enquanto Amido e RB tiveram ajuste linear. Embora as equações
357 ajustadas tenham sido significativas, os coeficientes de determinação da TCR em
358 SW (R²=0,49) e do Amido em SH:SW (R²=0,20) foram baixos, sugerindo que
359 estas variáveis, nestas condições, são pouco influenciada pelo tempo (Tabela 1).

360 A TCR representa a capacidade de crescimento da lentilha-d'água entre os
361 períodos de coleta, o que pode ter contribuído para a observação dos coeficientes
362 de determinação de até 0,72. De modo geral, os dados refletem o esperado,
363 como, por exemplo, os altos coeficientes de determinação de RB, fortemente
364 influenciada pelo tempo, dado o acúmulo de biomassa, e os oscilantes
365 coeficientes de amido, dada sua função metabólica (Tabela 1). Em SW foi

366 observado o maior coeficiente de determinação ($R^2=0,94$) para amido, refletindo a
 367 indução crescente de amido após a redução do crescimento.

368 **Tabela 1.** Equações ajustadas por análise de regressão e seus respectivos coeficientes de
 369 determinação (R^2) e de variância (C.V.%) para TCR, Amido e RB de *L. aequinoctialis* clone M1 em
 370 1, 3, 6, 10, 15 e 21 dias de cultivo em função do meio de cultivo.

Parâmetro	Meio	Equação ajustada	R^2	C.V. (%)
TCR	SH	$\hat{y} = -0,0026x^2 + 0,0487x + 0,108^{**}$	0,64	19,20
	SH:SW	$\hat{y} = -0,0028x^2 + 0,0514x + 0,133^{**}$	0,72	10,21
	SW	$\hat{y} = -0,00006x^2 - 0,0113x + 0,266^{**}$	0,49	22,01
Amido	SH	$\hat{y} = 1,0566x + 5,7494^{**}$	0,75	3,04
	SH:SW	$\hat{y} = 0,2952x + 8,5122^{**}$	0,20	2,88
	SW	$\hat{y} = 1,0622x - 0,2351^{**}$	0,94	1,54
RB	SH	$\hat{y} = 91,97x - 233,33^{**}$	0,95	13,27
	SH:SW	$\hat{y} = 106,49x - 231,81^{**}$	0,93	5,80
	SW	$\hat{y} = 12,15x + 12,59^{**}$	0,94	7,57

371 ns – não significativo; ** – significativo ao nível de 1% de probabilidade.

372 Com base os dados de teor de amido e biomassa acumulada foi possível
 373 calcular o rendimento teórico para produção de bioetanol a partir da biomassa
 374 fresca de *Lemna aequinoctialis* M1 após 15 e 21 dias de cultivo (Tabela 2).

375 **Tabela 2.** Rendimento teórico em bioetanol ($L \cdot ha^{-1}$) a partir da biomassa *Lemna aequinoctialis*
 376 clone M1 acumulada após 15 e 21 dias de cultivo em meio SH, SH:SW e SW. As letras
 377 representam a diferença de médias entre os meios, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

	Rendimento teórico em bioetanol (RTEtOH)	
	15º dia	21º dia
	SH	2017,2±62,4 ^a
SH:SW	1698,2±21,5 ^b	1398,7±18,2 ^b
SW	169,2±5,0 ^c	287,2±12,9 ^c

378 Contudo, temos que considerar a tecnologia para produção de bioetanol a
 379 partir de biomassa de lentilhas-d'água baseia-se na sua biomassa seca (Xu et al.,
 380 2012). Assim, considerando que *Lemna* spp. retenha pelo menos 3% da sua
 381 biomassa após secagem (Mkandawire e Dudel, 2007), os dados revelam que
 382 seria possível alcançar a produção anual de bioetanol, por tonelada, de até cerca
 383 de 1400 L para SH e de 1200 L para SH:SW em ciclos de colheita de 15 dias, e
 384 de até cerca de 140 L para SW, com colheita a cada 21 dias. Estas estimativas

385 mostram-se compatíveis com outros estudos (Xu et al., 2012; Yu et al., 2014) e
386 corroboram o relevante potencial de lentilha-d'água para produção de bioetanol.

387 No entanto, reconhece-se na necessidade de amplos estudos de
388 caracterização e balanço energético desta produção a partir da biomassa de
389 lentilhas-d'água, o que certamente contribuirá substancialmente para aplicação
390 fim de sistemas de fitorremediação de efluentes. Yu et al. (2014) evidenciaram a
391 necessidade da seleção de lentilhas-d'água com produção de biomassa e taxa de
392 crescimento em águas residuais similares às exibidas em meio SH 1X,
393 viabilizando o cultivo de lentilhas-d'água em larga escala a partir de águas
394 residuais, agregando valor e mais benefícios ecológicos e ambientais a sistemas
395 de tratamento de esgoto. Neste estudo, reforçamos o potencial do meio SH 0.5X
396 para induzir maior crescimento de *L. aequinoctialis*, exibindo TCR superiores as
397 observadas em meio SH 1X, a partir de estudos prévios no laboratório, e ainda,
398 ao incluir o meio SH:SW, foi possível observar que este meios estimulou ainda
399 mais o crescimento do clone M1, quando comparado ao meio SH 0,5X, um
400 achado inédito que encoraja pesquisas de caracterização e composição de meios
401 alternativos e de baixo custo para produção de biomassa de lentilha-d'água em
402 larga escala.

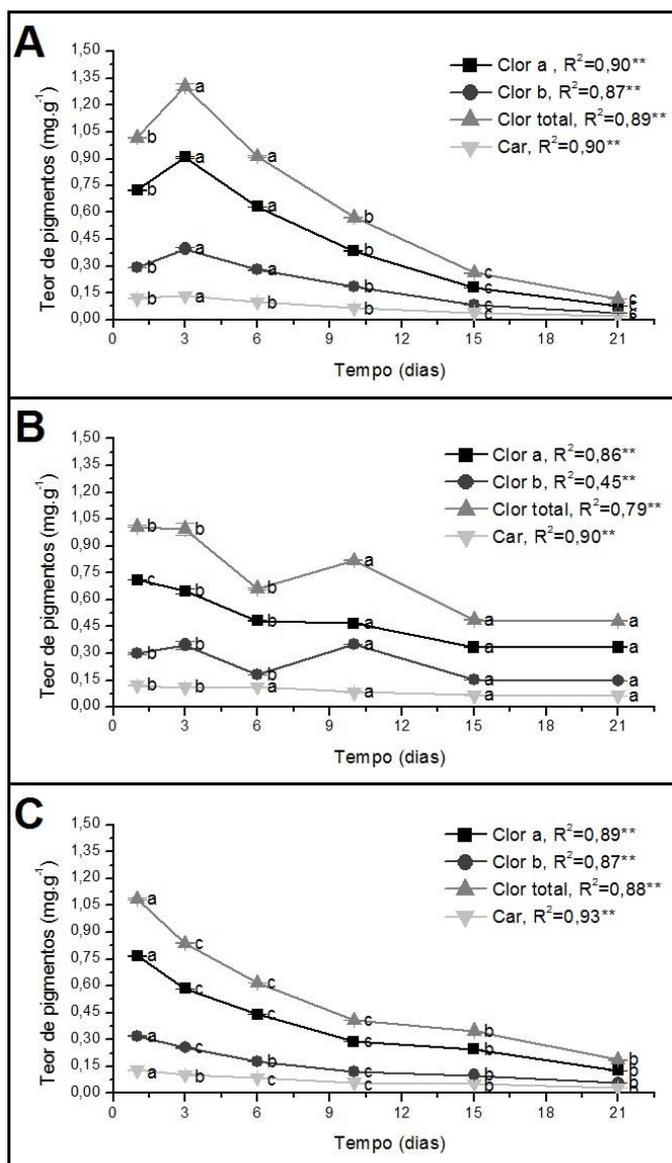
403 Além disso, *L. aequinoctialis* M1 foi capaz de crescer a partir da água de
404 esgoto da lagoa de polimento da ETE Mangueira, Recife, apresentando produção
405 de biomassa em torno de 250 g.m^{-2} (Figura 1C) com relevante teor de amido
406 (21,5%) após 21 dias de cultivo (Figura 1B). Além disso, a determinação da
407 concentração residual de NT, $\text{NH}_4\text{-N}$ e PT em SW após cultivo de *L. aequinoctialis*
408 M1, mostrou redução de até 43,8% e 45,9% para NT e $\text{NH}_4\text{-N}$, respectivamente, e
409 até 68,6% para FT. Estes dados demonstram que a lentilha-d'água nativa pode

410 contribuir positivamente em sistemas de tratamento de esgoto, como uma etapa
411 complementar. Embora em SH e, até mesmo, SH:SW, *L. aequinoctialis* M1 tenha
412 alcançado taxa de crescimentos e produção de biomassa superiores a SW, o
413 custo elevado e os impactos ambientais destes cultivos, inviabiliza sua utilização
414 para produção de biomassa (Yu et al., 2014), mas se mostra muito atrativo para
415 bioprodução (Stomp, 2005).

416 3.2 Pigmentos fotossintetizantes

417 O teor de pigmentos fotossintetizantes em *L. aequinoctialis* M1 cultivada em
418 SH, SH:SW e SW são apresentados na Figura 2. Observa-se que quando
419 cultivada em SW, *L. aequinoctialis* M1 investiu na biossíntese de clorofila e
420 carotenoides logo no 1º dia (Figura 2C), enquanto que no SH esta resposta é
421 observada apenas no dia 3 (Figura 2A). No entanto, em SH:SW, *L. aequinoctialis*
422 M1 foi capaz de ajustar o teor de pigmentos no 10º dia, quando incrementou a
423 biossíntese de clorofila b (Figura 2B), o que, possivelmente, contribuiu para
424 manutenção da fotossíntese e da viabilidade das plantas para além dos 21 dias
425 de cultivo (Figura S1).

426 O teor de pigmento mostrou interação com o tempo de cultivo ($p < 0,01$), que
427 afeta negativamente o conteúdo de clorofilas e carotenoides, o que foi
428 corroborado pela análise de regressão polinomial, que revelou ajuste linear
429 decrescente dos pigmentos em relação ao tempo, com valores altos de
430 coeficientes de determinação ($R^2 > 0,75$), com exceção da clorofila b em SH:SW
431 ($R^2 = 0,45$), refletindo o incremento da biossíntese deste pigmento no 10º dia de
432 cultivo, modulando seu conteúdo nesta condição (Figura 2).



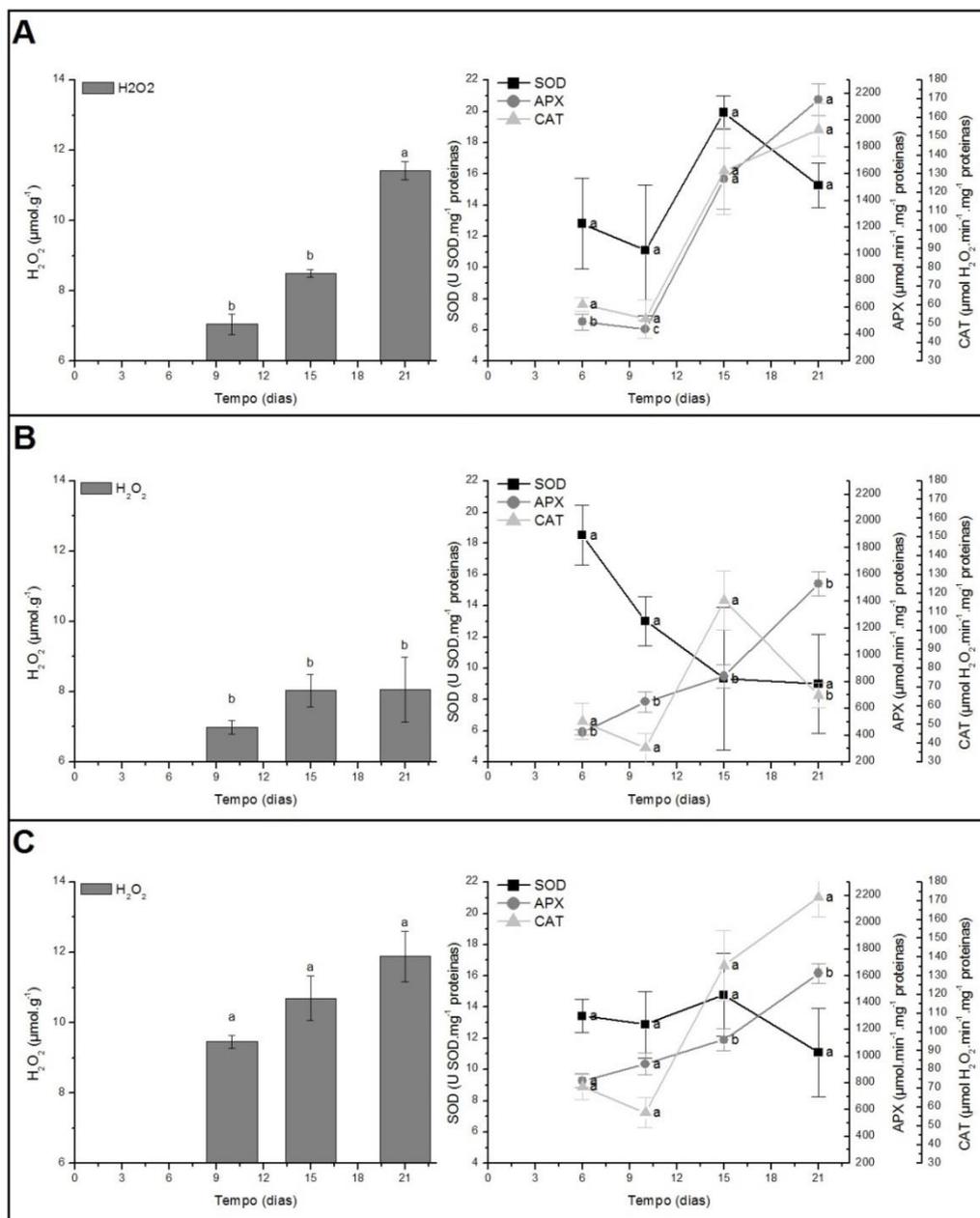
433
 434 **Figura 2.** Monitoramento do teor de pigmentos fotossintéticos e de carotenoides de *Lemna*
 435 *aequinoctialis* clone M1 cultivada em SH (A), em SH:SW (B) e em SW (C) durante 21 dias. As
 436 letras representam a comparação estatística do mesmo parâmetro (clorofila a, b e total e
 437 carotenoides) entre as condições A, B e C.

438 3.3 Metabolismo antioxidante

439 A fotossíntese é a principal fonte de energia e de componentes estruturais
 440 para crescimento, reprodução e outras funções vitais de plantas. No entanto, a
 441 fotossíntese é também a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS)
 442 (Foyer e Shigeoka, 2011). Em plantas C3, como as lentilhas-d'água, o H₂O₂ é
 443 uma das principais moléculas oxidantes (Foyer e Shigeoka, 2011). Assim como

444 outras ROS, o H_2O_2 pode atuar como molécula de sinalização ativando e
445 modulando a resposta de enfrentamento do fator de estresse, podendo contribuir
446 para a adaptação e/ou tolerância do estresse na planta, contudo os níveis devem
447 ser controlados para manutenção da homeostase redox da célula vegetal
448 (Triphaty e Oelmüller, 2012). Exigindo, portanto, mecanismos antioxidantes para
449 regular a produção e os níveis de ROS eficazmente, mantendo equilíbrio dos
450 níveis intracelulares de ROS.

451 A Figura 3 apresenta os níveis de H_2O_2 e a atividade específica das enzimas
452 SOD, APX e CAT no clone M1 para os meios de cultivo avaliados, o que permitiu
453 observar padrão de desequilíbrio redox de *L. aequinoctialis* M1 cultivada em SH
454 (Figura 3A) e SW (Figura 3C), observando o incremento de 61,8% e 25,7% nos
455 níveis de H_2O_2 , respectivamente, no 21º dia, em relação ao 10º dia. Este
456 incremento foi acompanhado pelas enzimas APX e CAT, enquanto a enzima SOD
457 reduz drasticamente sua atividade após o 15º dia. Estes resultados podem estar
458 associados à debilitação das plantas no 21º dia, mais evidenciada em SH (Figura
459 S1A, S1D) e SW (Figura S1C, S1F). Diferentemente, em SH:SW, *L. aequinoctialis*
460 M1 apresentou leve incremento no teor de H_2O_2 (15,2%) no 21º dia, em relação
461 10º dia (Figura 3B). De fato, *L. aequinoctialis* M1 crescendo a partir de SH:SW foi
462 capaz de manter a viabilidade para além de 21 dias e teores de pigmentos
463 fotossintetizantes mais elevados. Contudo, SH:SW apresentava limitação de
464 crescimento, devido a área, já a partir do 6º dia (Figura 1A), que foi acompanhado
465 pela atividade de SOD (Figura 3B).



466
 467 **Figura 3.** Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e atividade específica das enzimas superóxido
 468 dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) do metabolismo antioxidante em
 469 *Lemna aequinoctialis* clone M1 cultivada em SH (A), em SH:SW (B) e em SW (C) durante 21 dias.
 470 Letras minúsculas representam a comparação estatística da atividade específica da mesma
 471 enzima entre as condições A, B e C. Letras maiúsculas representam a comparação estatística do
 472 conteúdo de H_2O_2 entre as condições A, B e C.

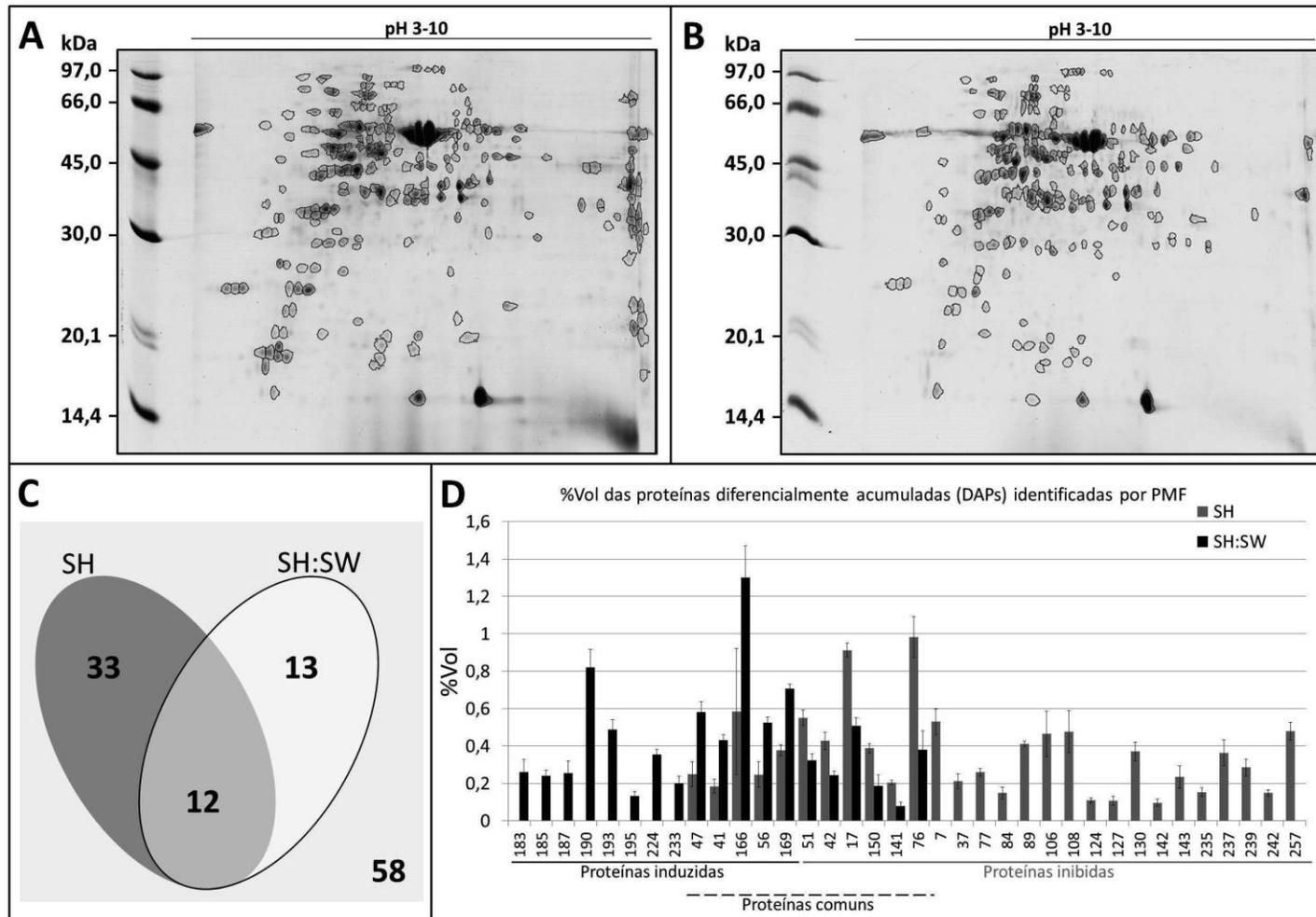
473 Os dados de atividade enzimática evidenciam relevante modulação da APX
 474 em *L. aequinoctialis* M1 cultivada em SH, SH:SW e SW, sugerindo seu importante
 475 papel para manutenção do balanço redox de lentilhas-d'água. No entanto, em

476 plantas C3 é preconizada maior modulação da CAT devido à intensa
477 fotorrespiração apresentada nestas plantas (Willekens et al., 1997). Embora as
478 lentilhas-d'água apresentem metabolismo C3 (Oukarroum et al., 2015), o estilo de
479 vida aquático favorece a eficiência fotossintética, sugerindo a redução da
480 fotorrespiração e do papel da CAT durante o crescimento destas plantas.

481 *3.4 Proteômica diferencial de L. aequinoctialis clone M1 crescida em meio SH:SW,*
482 *usando SH como referência*

483 No 6º dia de experimento, *L. aequinoctialis* M1, exibia frondes saudáveis, não
484 sendo identificados sinais aparentes de estresses e danos severos, apresentando
485 características peculiares ao crescimento nos meios de cultivo. O protocolo de
486 extração de proteínas solúveis totais apresentou rendimento médio de 6,1 mg
487 proteínas.g⁻¹ de tecido vegetal de lentilha-d'água, mostrando proteínas íntegras e
488 compatíveis com eletroforese bidimensional.

489 A Figura 4 mostra os mapas proteômicos representativos de *L. aequinoctialis*
490 M1 cultivada em SH (Figura 4A) e SH:SW (Figura 4B), nos quais foram
491 detectados, em média, 214 e 215 spots, respectivamente. A análise comparativas
492 dos géis mostrou variação do *r-value*, para análise correlação das imagens, de
493 0,9090 a 0,9516 (inter-tratamentos) e de 0,9393 a 0,9757 (intra-tratamento),
494 permitindo a detecção das proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs). A
495 Figura 4C apresenta o diagrama de Venn para distribuição das 58 DAPs
496 detectadas, que representam o proteoma diferencial de *L. aequinoctialis* M1 em
497 resposta a adição de SW ao meio de cultivo SH.



498
499
500
501
502

Figura 4. Mapas proteômicos 2-DE (eletroforese bidimensional), distribuição e variação de acúmulo das proteínas identificadas em *Lemna aequinoctialis* clone M1. A) Gel 2D-PAGE para SH; B) Gel 2D-PAGE para SH:SW; C) Diagrama de Venn para o número de spots diferencialmente acumulados em SH:SW, usando SH como referência; D) Variação do nível de acumulação de proteínas identificadas, representada por porcentagem de volume (% Vol.) normalizada, com classificação dos spots (*up*- e *down*-acumulados), incluindo spots comuns.

503 Recentemente, dois estudos de análise proteômica de lentilha-d'água foram
504 publicados, os quais investigam a indução do acúmulo de amido por exposição de
505 *Landoltia punctata* ao déficit de nutrientes (Huang et al., 2014) e ao regulador
506 vegetal uniconazole (Huang et al., 2015), utilizando uma abordagem proteômica
507 de larga escala. Assim, este estudo é pioneiro ao investigar a proteômica de *L.*
508 *aequinoctialis*, utilizando a abordagem 2-DE, associada ao crescimento em água
509 residual de estação de tratamento de esgoto.

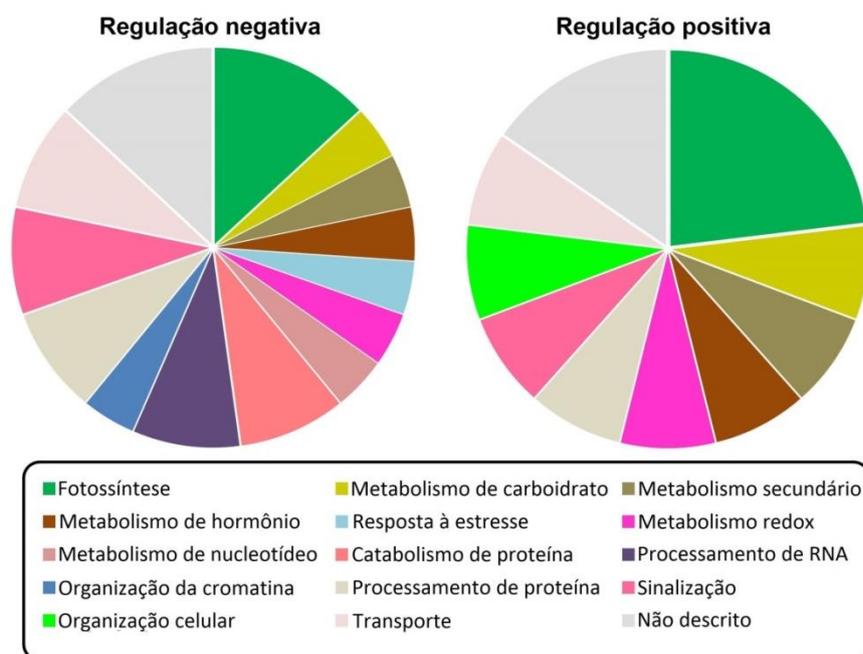
510 3.4.1 Identificação das proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs)

511 Foram identificadas 36 (62,1%) DAPs responsivas à adição de efluente ao
512 meio SH, sendo 13 (68,4%) das proteínas induzidas (Tabela 3) e 23 (58,9%) das
513 proteínas inibidas (Tabela 4). A Figura 4D mostra o valor da porcentagem de
514 volume (%Vol.) das DAPs identificadas, incluindo as proteínas comumente
515 acumuladas por *L. aequinoctialis* M1, mas que foram diferentemente reguladas.

516 *L. aequinoctialis* M1 cultivada em SH:SW induziu seis vezes mais a expressão
517 de uma ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) comum a SH
518 (SpotID 166, Tabela 3), contudo outros produtos do gene RBCL também foram
519 detectados como exclusivos de SH (SpotID 84, Tabela 4) e mesmo de SH:SW
520 (SpotID 190, Tabela 3). RuBisCO é relatada como um dos interferentes da análise
521 do proteoma foliar por 2-DE, atribuído a sua relevante abundância e seus
522 diferentes estágios de ativação, capaz de distorcer a migração das proteínas
523 (Krishnan e Natarajan, 2009). A indução de RuBisCO, quando observados
524 redução de pigmentos fotossintetizantes (Figura 2) e manutenção da alta taxa de
525 crescimento (Figura 1), pode estar associada ao incremento da fotorrespiração
526 para compensação da fotossíntese (Timm et al., 2016).

527 Esta hipótese é apoiada pela indução (3x) da glicolato oxidase (GOX, SpotID
 528 56, Tabela 3), uma enzima chave da fotorrespiração responsável pela oxidação
 529 de glicolato, produto da hidrólise de fosfoglicolato (2PG), no peroxissoma,
 530 gerando H₂O₂, que é decomposto por catalase (Bauwe et al., 2012). A catalase-2
 531 foi induzida (2x) em SH:SW (SpotID 169, Tabela 3), contudo a atividade CAT foi
 532 ligeiramente menor nesta condição. Neste contexto, a proteína serina
 533 hidroximetiltransferase 1 (SHM1, SpotID 193, Tabela 3) também induzida pode
 534 atuar na modulação e controle da via fotorrespiratória (Jamai et al., 2009).

535 Enquanto a proteína intensificadora da reação com O₂ tipo 2 (OEE2, SpotID
 536 17 comum) e a subunidade alfa da ATP sintase (ATPA cloroplastidial, SpotID
 537 106), de fotossíntese, foram inibidas (Tabela 4), reforçando a possível diminuição
 538 do nível de fotossíntese em SH:SW. Entretanto, na análise de ontologia gênica
 539 (GO), a fotossíntese aparece para ser regulada positivamente por *L.*
 540 *aequinoctialis* M1 cultivada em SH:SW (Figura 5).



541 **Figura 5.** Categorização dos termos de ontologia gênica para proteínas diferencialmente
 542 acumuladas em *Lemna aequinoctialis* clone M1 crescida em meio SH:SW, usando SH como
 543 referência.
 544

545 **Tabela 3.** Identificação de proteínas de *Lemna aequinoctialis* clone M1 induzidas para crescimento em meio SH:SW, usando SH como referência. Anotação
 546 putativa a partir de MALDI-ToF/ToF MS e analisado via PMF e MS/MS Ion Search (*) na plataforma Mascot.

SpotID	SH:SW/SH Ratio	ANOVA	Descrição	Score	Cobertura % seq.	e-value	pI _{cal} /pI _{obs}	M _{cal} /M _{obs}	Acesso
Common proteins									
41	2,3	0,00673	Proteína de ligação à mirosinase tipo 2 [<i>Brassica napus</i>]	83	29	2,2E-02	8.66/8.13	102318/34686	XP_013724788
47	2,3	0,01801	Proteína de resistência a fármacos pleotrópicos TUR2 [<i>Spirodela polyrhiza</i>]	50	13	3,8E-02	8.17/6.58	163221/37452	O24367
56	3,2	0,02013	Glicolato oxidase [<i>Wolffia australiana</i>]	53	34	1,5E-02	9.06/9.61	40229/39691	H6U7Z6
166	6,7	0,01260	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Fragment) [<i>Lemna aequinoctialis</i>]	117	38	6,7E-09	6.32/6.25	50060/54621	Q8WHI8
169	1,9	0,00111	Catalase-2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	73	32	2,3E-03	6.63/7.54	57237/55619	P25819
Proteins detected in only SH:SW medium									
183	-	0,01618	Proteína serina/treonina quinase PRP4 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	64	19	2,2E-02	8.05/6.05	77746/28889	A8MR79
185	-	0,00117	Proteína não caracterizada [<i>Zea mays</i>]	64	16	3,5E-02	9.45/5.71	90401/35779	C0PCC2
187	-	0,01565	Actina [<i>Volvox carteri</i>]	63	33	1,8E-02	5.30/5.74	42017/40192	P20904
190	-	0,00099	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Fragment) [<i>Lemna aequinoctialis</i>]	108	42	5,3E-08	6.32/6.98	50060/54144	Q8WHI8
193	-	0,00079	Serina hidroximetiltransferase 1, mitochondrial [<i>Flaveria pringlei</i>]	60	33	3,6E-02	8.72/7.80	57127/56097	P49357
195	-	0,00521	Fator de ribosilação de ADP da proteína AGD4 ativadora de GTPase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	76	20	1,0E-03	6.14/5.69	87950/67501	Q9SMX5
224	-	0,00026	Aleno oxido sintase [<i>Lemna paucicostata</i>]	53	30	1,6E-02	8.11/5.90	53012/46510	F2Q7G7
233	-	0,00784	Proteína não caracterizada [<i>Zea mays</i>]	65	84	2,7E-02	10.94/7.27	5686/59081	B6SQK4

547

548 **Tabela 4.** Identificação de proteínas de *Lemna aequinoctialis* clone M1 inibidas para crescimento em meio SH:SW, usando SH como referência. Anotação
 549 putativa a partir de MALDI-ToF/ToF MS e analisado via PMF e MS/MS Ion Search (*) na plataforma Mascot.

SpotID	SH:SW/SH Ratio	ANOVA	Descrição	Score	Cobertura % seq.	e-value	pI_{cal}/pI_{obs}	M_{cal}/M_{obs}	Acesso
Comum proteins									
17	-1,8	0,00210	Proteína intensificadora da reação com O ₂ tipo 2, cloroplastidial [<i>Cucumis melo</i>]*	73	3	8,7E-04	8.29/4.87	28364/24342	XP_016901191
42	-1,7	0,02144	Hexosiltransferase [<i>Saccharum hybrid cultivar</i>]	47	42	5,0E-02	6.89/9.02	21601/35439	A0A059Q393
51	-2,6	0,04567	Proteína At1g21780 contendo domínio BTB/POZ [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	60	24	4,3E-02	5.18/6.46	38053/38466	Q9XHZ8
76	-2,6	0,01587	Fator de alongamento TuA, chloroplastidial [<i>Nicotiana sylvestris</i>]*	71	2	1,0E-05	6.34/5.95	52152/47760	Q40450
141	-2,6	0,00643	Tiorredoxina TTL1 com repetição TPR [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	59	25	4,5E-02	9.03/5.75	76980/86122	Q9MAH1
150	-2,1	0,01133	Proteína não caracterizada T14K23_10 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	63	38	2,5E-02	6.54/4.37	29295/19737	Q9M3G6
Proteins detected in only one condition									
7	-	0,03109	Proteína AT1G67910 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	62	56	3,5E-02	9.81/4.05	10105/19012	Q9C9V7
37	-	0,00584	Proteína F3F19.2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	66	24	1,1E-02	8.18/9.53	45397/34534	Q9SAD5
77	-	0,00022	Proteína At5g59600 contendo repetição pentatricopeptídica [<i>Glycine max</i>]	80	15	4,1E-02	8.63/4.89	61599/48998	XP_003539074
84	-	0,00814	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Fragment) [<i>Lemna aequinoctialis</i>]	60	32	3,4E-03	6.32/7.02	50060/51152	Q8WHI8
89	-	0,00001	GTP difosfoquinase RSH2, cloroplastidial [<i>Oryza sativa</i>]	60	14	3,8E-02	6.49/5.10	79953/51194	Q7XAP4
106	-	0,01885	Subunidade alfa da ATP sintase, cloroplastidial [<i>Lemna minor</i>]	51	34	2,6E-02	5.57/5.51	55053/58120	A9L981
108	-	0,01317	Subunidade beta da ATP sintase, mitocondrial [<i>Oryza sativa</i>]	58	40	5,6E-02	5.95/5.41	59012/58028	Q01859
124	-	0,00162	Apirase 2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	59	21	4,6E-02	6.54/5.67	51966/66696	Q9SPM5
127	-	0,01023	Subunidade 1 do complex organelar relacionado à biogênese do lisossomo [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	60	35	3,9E-02	5.99/5.68	17481/71496	O22929
130	-	0,00187	Citocromo P450 [<i>Saccharum hybrid cultivar</i>]	48	18	3,9E-02	9.07/5.15	56825/78758	A0A059PZW5
142	-	0,00933	Proteína semelhante à agamous 26 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	64	23	1,9E-02	9.14/6.18	42109/89386	F4K1D2
143	-	0,01671	Fator de licenciamento MCM6 de replicação de DNA [<i>Oryza sativa</i>]	61	21	3,2E-02	5.55/4.99	93168/91461	B8AZX3
235	-	0,00243	Proteína hipotética AMTR_s00014p00234840 [<i>Amborella trichopoda</i>]	84	55	1,8E-02	10.45/5.57	12104/29228	ERN09173
237	-	0,00572	Proteína Rab2A de ligação à GTP [<i>Saccharum officinarum</i>]	48	52	4,1E-02	6.96/6.42	23289/37275	A2T1D9
239	-	0,00336	Proteína F-box At5g56380 associada à FBD [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	59	22	4,7E-02	8.89/7.47	50670/58113	Q9FM93
242	-	0,00080	Proteína semelhante à agamous 26 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	62	21	3,2E-02	9.14/7.11	42109/84141	F4K1D2
257	-	0,00050	Proteína homóloga de triagem vacuolar 35 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	60	22	5,4E-02	5.03/4.37	42951/19149	Q0WTD7

550 A análise GO é baseada no agrupamento de termos GO representativo para
551 diversas etapas de um determinado processo biológico em categorias mais
552 genéricas. Por exemplo, proteínas de fotorrespiração, de fotosistema ou de
553 fixação de carbono são agrupadas na categoria fotossíntese. Contudo, a análise
554 GO demonstra a plasticidade de *L. aequinoctialis* M1 para se reorganizar,
555 buscando promover sua adaptação a condição/meio de cultivo.

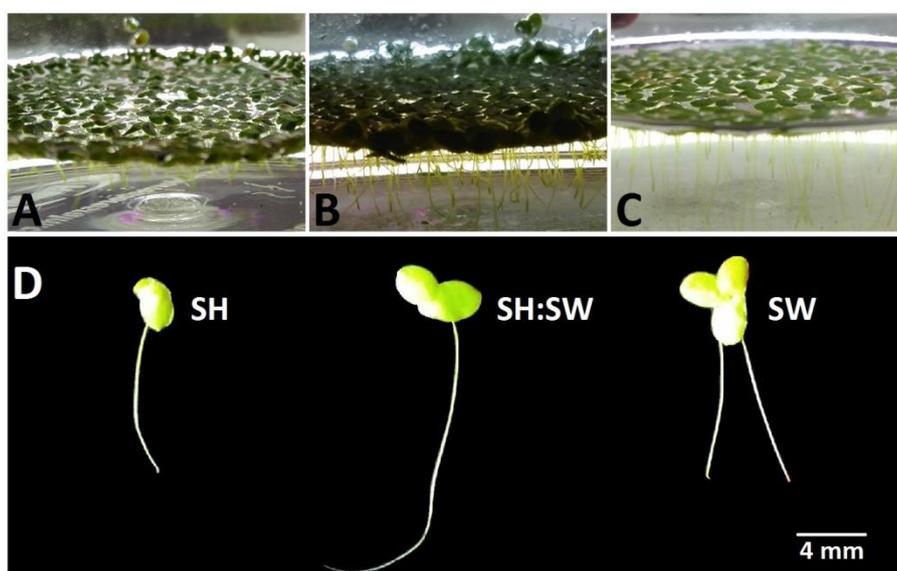
556 A análise GO demonstra que as categorias de resposta a estresse, de
557 metabolismo de nucleotídeos, de processamento de RNA, de catabolismo de
558 proteínas e de organização da cromatina foram exclusivamente reguladas
559 negativamente por *L. aequinoctialis* M1 cultivada em SH:SW (Figura 5). No total,
560 sete proteínas identificadas foram associadas a estas categorias GO, das quais
561 três foram representadas apenas por uma proteína cada: i) resposta a estresse,
562 onde a GTP difosfoquinase RSH2 cloroplastidial (SpotID 89, Tabela 4), que é uma
563 provável guanosina 3'-difosfato 5'-difosfato (ppGpp) sintetase, tem sido relatada
564 para estar envolvida na resposta rápida da planta a estresses bióticos e abióticos,
565 atuando na sinalização de planta (van der Biezen et al., .2000); ii) metabolismo de
566 nucleotídeos, a proteína apirase 2 (APY2, SpotID 124, Tabela 4), que catalisa a
567 hidrólise de ligações fosfoanidrido de nucleosídeos tri- e di-fosfatos, é capaz de
568 atuar na regulação do nível de ATP extracelular, função importante para
569 regulação da função estomática de *Arabidopsis thaliana* (Clark et al., 2011); iii) e,
570 organização da cromatina, processo desempenhado pelo fator de licenciamento
571 MCM6 de replicação de DNA (SpotID 143, Tabela 4), que participa do complexo
572 de manutenção de mini-cromossomo (MCM2-7) possui atividade helicase e que
573 pode atuar sozinha como subunidade desenrolando estruturas secundárias de

574 genes sensíveis a estresses, além de atuar na replicação e no reparo de DNA
575 (Tuteja et al., 2011).

576 Ainda em relação às categorias GO para processo biológico exclusivamente
577 reguladas negativamente, a proteína At1g21780 contendo domínio BTB/POZ
578 (SpotID 51, Tabela 4), reprimida cerca de três vezes em SH:SW, e a proteína F-
579 box At5g56380 associada à FBD (SpotID 239, Tabela 4) detectada apenas em SH
580 foram agrupadas em catabolismo de proteínas, sugerindo que possam atuar em
581 conjunto na modulação do processo a ubiquitinação e subsequente degradação
582 de proteínas-alvo. Enquanto a proteína semelhante à agamous 26, detectada a
583 partir de dois spots (AGL26, SpotID 142 e 242, Tabela 4), foi agrupada para
584 categoria GO de processamento de RNA. AGL26 é um membro tipo I da família
585 de fatores de transcrição MADS-box, ainda pouco caracterizada, mas que tem
586 sido demonstrado para ser positivamente regulado pela privação de nitrogênio em
587 tecido radicular (Gan et al., 2005).

588 Categoria GO exclusivamente regulada positivamente em SH:SW (Figura 5)
589 foi a de organização celular, representada pela proteína actina (ACT, Spot 187,
590 Tabela 3). Actinas são proteínas altamente conservadas, envolvidas com vários
591 processos de motilidade celular, expressas constitutivamente em todas as células
592 eucarióticas (<http://www.uniprot.org/uniprot/P20904>). Contudo, o mapeamento dos
593 termos de ontologia gênica mostrou alta similaridade com actinas de *Arabidopsis*
594 *thaliana* envolvidas com respostas estímulos ambientais diversos como
595 fitohormônios e luminosidade, além de, atuar na divisão celular através da
596 modulação do citoesqueleto, na maturação de sementes e no desenvolvimento de
597 raiz.

598 De fato, até o 6^o dia de cultivo, *L. aequinoctialis* M1 apresentava raízes bem
 599 desenvolvidas apenas a partir de plantas crescidas em meio contendo SW (Figura
 600 6B e 6C) quando comparadas ao meio SH (Figura 6A), que apresentava raízes
 601 em desenvolvimento. No entanto, no 15^o dia de cultivo as plantas crescidas em
 602 SH já apresentavam raízes bem desenvolvidas, de tamanho aproximado aos das
 603 plantas crescida apenas em SW, contudo as plantas SW apresentavam fronde
 604 característica com duas raízes, enquanto as plantas crescidas em SH:SW
 605 apresentavam raiz mais alongada (Figura 6D).



606 **Figura 6.** Plantas de *Lemna aequinoctialis* clone M1 cultivadas durante seis dias (A, B e C) e
 607 plantas cultivadas por 15 dias (D). As plantas cultivadas em meio SH com raízes pouco
 608 desenvolvidas (A). Plantas cultivadas em meio SH:SW e SW com raízes desenvolvidas (B e C,
 609 respectivamente). Comparação da morfologia das frondes e raiz de plantas cultivadas em SH,
 610 SH:SW e meio SW após 15 dias de cultivo (D).

612 Neste contexto, a proteína de ligação à mirosinase tipo 2 (SpotID 41, Tabela
 613 3) foi induzida cerca de duas vezes mais em SH:SW. Esta proteína tem sido
 614 descrita para atuar em diversos processos biológicos, dentre eles o
 615 desenvolvimento de estruturas radiculares e florais. Em *Arabidopsis*, proteínas de
 616 ligação à mirosinase tipo 2 (MYR2) são mais abundantes em tecido radicular,

617 onde podem atuar na regulação do crescimento radicular e na biossíntese de
618 auxinas em raízes (Fu et al., 2016).

619 A auxina tem sido relatada para interagir sinergicamente ou de forma
620 antagônica com outros hormônios vegetais para atuar como regulador mestre da
621 morfogênese e desenvolvimento das raízes (Saini et al., 2013). Aqui, os dados
622 apontam para atuação da auxina na modulação da resposta de *L. aequinoctialis*
623 clone M1 à adição de SW ao meio SH, indicando que estudos complementares
624 são necessários para compreender a atuação da auxina na regulação das DAPs
625 associadas ao crescimento/desenvolvimento de tecido radicular em *L.*
626 *aequinoctialis*, como a tiorredoxina TTL1 com repetição TPR (SpotID 141, Tabela
627 4), que pode ser regulada pelos níveis de SOD, envolvida na resposta de
628 adaptação ao ambiente, e a subunidade 1 do complexo organelar relacionado à
629 biogênese do lisossomo (BLOS1, SpotID 127, Tabela 4) inibidas em SH:SW. E
630 ainda a proteína homóloga de triagem vacuolar 35 (SpotID 257, Tabela 4), que foi
631 descrita para modular o metabolismo de auxina pela desregulação do acúmulo de
632 transportadores específicos de auxina (Nodzyński et al., 2013).

633 Porém, proteínas responsivas a outros hormônios foram detectadas: a proteína
634 de resistência a fármacos pleotrópicos TUR2 (SpotID 47 comum, Tabela 3) e a
635 proteína aleno óxido sintase (AOS, SpotID 224, Tabela 3), mais acumuladas em
636 SH:SW; e a citocromo P450 (SpotID 130, Tabela 3) negativamente reguladas em
637 SH:SW. Estes dados sugerem que *L. aequinoctialis* M1 modula fortemente o
638 metabolismo de hormônio para manutenção do crescimento e desenvolvimento
639 nos meios de cultivo. Citocromos P450 também foi anteriormente sugerido como
640 um potencial marcador para melhoramento/seleção de plantas para
641 fitorremediação (Morant et al., 2003). Em lentilha-d'água, citocromo P450

642 demonstrou ser responsivo ao excesso de amônio em níveis tóxicos (Wang et al.,
643 2016).

644 A indução da proteína de resistência a fármacos pleotrópicos TUR2 e da AOS
645 em SH:SW pode ter contribuído significativamente para adaptação da lentilha-
646 d'água para adição de SW ao meio de cultivo SH. Proteína de resistência a
647 fármacos pleotrópicos TUR2 é um homólogo do complexo transportador ABC
648 envolvido no efluxo dependente de ATP de diversos compostos citotóxicos,
649 induzido em lentilhas-d'água durante condições adversas e em resposta a
650 hormônios, como a ácido abscísico (Smart e Fleming, 1996). Enquanto, AOS,
651 uma enzima-chave da biossíntese de ácido jasmônico, que pode atuar via de
652 biossíntese de oxilipinas, moléculas sinalizadoras que regulam o crescimento, o
653 desenvolvimento durante estresses abióticos (Savchenko et al., 2014).

654 A percepção de um estímulo e a efetiva resposta molecular é mediada por
655 vias de sinalização. Em plantas a transdução de sinal é extremamente complexa,
656 por envolver diversas moléculas, incluindo hormônios gasosos, mas são estas
657 vias responsáveis pela orquestração bioquímica e fisiológica de todos os
658 processos biológicos de plantas (Mulligan et al., 1997). Nesta categoria, ainda
659 foram detectadas o fator de ribosilação de ADP da proteína AGD4 ativadora de
660 GTPase (SpotID 195, Tabela 3), uma ARF-GTPase, detectada apenas em
661 SH:SW, e a proteína Rab2A de ligação à GTP (SpotID 237, Tabela 4), detectada
662 apenas em SH. Estas proteínas são descritas para atuar como proteínas
663 ativadoras, envolvidas na regulação de diversos processos biológicos através da
664 modulação de vias de transdução de sinal, sugerindo sua atuação na resposta
665 específica a condição de cultivo.

666 Dentre as funções de vias transdutoras de sinais, está a regulação de
667 expressão gênica. *L. aequinoctialis* M1 mostrou diferentes proteínas para atuar na
668 modulação da expressão, como a proteína At5g59600 contendo repetição
669 pentatricopeptídica (SpotID 77, Tabela 4) e o fator de alongamento TuA
670 cloroplastidial (SpotID 76, Tabela 4) que foram inibidos. Além do fator de
671 licenciamento MCM6 de replicação de DNA e da GTP difosfoquinase RSH2
672 inibidas, discutidas anteriormente, reforçando que *L. aequinoctialis* M1 induziu
673 vias de resposta a estresse já a partir do 6º dia de cultivo em meio SH, o que
674 pode estar associado à depleção de nutrientes, justificando o incremento de
675 proteínas associada ao crescimento e desenvolvimento de tecido radicular. Além
676 disso, estes dados corroboram a caracterização do sistema antioxidante (Figura
677 3), podendo o déficit de nutrientes está associado ao incremento de H₂O₂ e
678 desequilíbrio do balanço redox observado.

679 Quanto ao metabolismo de carboidratos, a análise GO identificou apenas
680 duas proteínas: a proteína serina/treonina quinase PRP4 (SpotID 183, Tabela 3),
681 induzida; e a hexosiltransferase (Spot ID 42 comum, Tabela 4), reprimida 1,7
682 vezes em SH:SW. Na análise de GO, a proteína serina/treonina quinase PRP4,
683 que mostrou similaridade com precursor mitocondrial de SHM1, anteriormente
684 discutida, foi classificada para estar envolvida também na interconversão da via
685 tetraidrofolato do metabolismo *one-carbon*. Enquanto, hexosiltransferase
686 mostrou similaridade com uma galactinol sintase 2 (GOLS2), envolvida na
687 biossíntese de oligossacarídeos da família rafinose que funcionam como
688 osmoprotetores (Taji et al., 2002).

689 O metabolismo de carbono de lentilhas-d'água tem recebido uma atenção
690 especial de pesquisas recentes, devido a sua capacidade de acumular elevada

691 quantidade de amido compatível com a produção de biocombustível (Cui e
692 Cheng, 2015). Estudos de proteômica da lentilha-d'água *Landoltia punctata*,
693 mostram que proteínas associadas ao metabolismo de carbono são pouco
694 ajustadas (Huang et al., 2014; Huang et al., 2015).

695 Por fim, seis proteínas desconhecidas ou pouco estudada foram detectadas,
696 quatro delas foram induzidas: a proteína não caracterizada T14K23_10 (SpotID
697 150 comum, Tabela 3), induzida cerca de duas vezes em SH:SW e as proteínas
698 não caracterizada (SpotID 185 e SpotID 233, Tabela 3) e proteína hipotética
699 AMTR_s00014p00234840 (SpotID 235, Tabela 3), detectadas apenas em SH:SW.
700 Enquanto, duas foram suprimidas em SH:SW: a proteína AT1G67910 (Spot ID 7,
701 Tabela 3) e a proteína F3F19.2 (SpotID 37, Tabela 3). O papel destas proteínas
702 continua obscuro para resposta de lentilhas-d'água a SW.

703

704 **4. Conclusões**

705 A adição de água de esgoto (SW) ao meio de cultivo SH induziu maior
706 crescimento da lentilhas-d'água, suportando a elevada produção de biomassa
707 como relevante teor de amido. O cultivo em meio SH:SW demonstrou que
708 estudos de meios alternativos podem viabilizar o equilíbrio custo-benefício para
709 implementação de sistemas de bioprodução de lentilhas-d'água. *Lemna*
710 *aequinoctialis* clone M1 pode ser potencialmente explorada em sistemas de
711 fitorremediação de efluentes, capaz de gerar biomassa para produção de
712 bioetanol. O proteoma diferencial corroborou o potencial plástico de *L.*
713 *aequinoctialis* para adaptar-se aos meios de cultivo, regulando rigorosamente a
714 expressão de genes de resposta. O desenvolvimento de tecido radicular parece
715 estar associado à resposta eficiente para adaptação de *L. aequinoctialis* quando

716 cultivada em efluente. A exploração dos processos biológicos regulados pode
717 contribuir para detecção e seleção de biomarcadores funcionais associados ao
718 cultivo de lentilhas-d'água em efluente.

719 **5. Agradecimentos**

720 Os autores agradecem aos patrocinadores: o Conselho Nacional de
721 Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq); a Financiadora de Estudos e
722 Projetos (FINEP); o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (INCT
723 Bioetanol) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
724 Pernambuco (FACEPE) para o apoio financeiro e bolsas de estudo; E a empresa
725 Lógica Ambiental Ltda. pela colaboração e pelas análises químicas de águas e
726 efluentes.

727 **6. Referências**

- 728 1. Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought
729 and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat.
730 Environment. 1337-1344.
- 731 2. Appenroth, K.J., Krech, K., Keresztes, A., Fischer, W., Koloczek, H., 2009.
732 Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and
733 *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation.
734 Chemosphere. 78, 216-23.
- 735 3. Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of
736 antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone
737 fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of
738 barley. Physiologia Plantarum. 280-292. doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x

- 739 4. Bauwe, H., Hagemann, M., Kern, R., Timm, S., 2012. Photorespiration has a
740 dual origin and manifold links to central metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15,
741 269-75.
- 742 5. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of
743 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal*
744 *Biochem.* 72, 248-54.
- 745 6. Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M.,
746 Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G., 2004. Blue silver: a very
747 sensitive colloidalCoomassie G-250 staining for proteome analysis.
748 *Electrophoresis.* 25, 1327-33.
- 749 7. Clark, G., Fraley, D., Steinebrunner, I., Cervantes, A., Onyirimba, J., Liu, A.,
750 Torres, J., Tang, W., Kim, J., Roux, S.J., 2011. Extracellular nucleotides and
751 apyrases regulate stomatal aperture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156, 1740-53.
- 752 8. Cui, W., Cheng, J.J., 2015. Growing duckweed for biofuel production: a review.
753 *Plant. Biol. (Stuttg).* 17, Suppl 1:16-23. doi: 10.1111/plb.12216.
- 754 9. Foyer, C.H., Shigeoka, S., 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant
755 functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 155, 93-100.
- 756 10. Fu, L., Wang, M., Han, B., Tan, D., Sun, X., Zhang, J., 2016. *Arabidopsis*
757 myrosinase genes AtTGG4 and AtTGG5 are root-tip specific and contribute to
758 auxin biosynthesis and root-growth regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 7-17(6). pii: E892.
759 doi: 10.3390/ijms17060892.
- 760 11. Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., Forde, B.G., 2005.
761 Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in
762 *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 222, 730-42.

- 763 12. Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in
764 higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-14.
- 765 13. Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Biochemical and developmental
766 characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84,
767 50-5.
- 768 14. Huang, M., Fang, Y., Liu, Y., Jin, Y., Sun, J., Tao, X., Ma, X., He, K., Zhao, H.,
769 2015. Using proteomic analysis to investigate uniconazole-induced phytohormone
770 variation and starch accumulation in duckweed (*Landoltia punctata*). *BMC*
771 *Biotechnol.* 15;15:81. doi: 10.1186/s12896-015-0198-9.
- 772 15. Huang, M., Fang, Y., Xiao, Y., Sun, J., Jin, Y., Tao, X., Ma, X., He, K., Zhao,
773 H., 2014. Proteomic analysis to investigate the high starch accumulation of
774 duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. *Indust Crops and*
775 *Products.* 59, 299-308.
- 776 16. Hurkman, W.J., Tanaka, C.K., 1986. Solubilization of plant membrane proteins
777 for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81, 802-6.
- 778 17. Jamai, A., Salomé, P.A., Schilling, S.H., Weber, A.P., McClung, C.R., 2009.
779 *Arabidopsis* photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the
780 mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Plant*
781 *Cell.* 21, 595-606.
- 782 18. Krishnan, H.B., Natarajan, S.S., 2009. A rapid method for depletion of Rubisco
783 from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance
784 proteins. *Phytochemistry.* 70, 1958-64.
- 785 19. Kuraishi, M.A., Sharma, S., 2011. Wastewater pollution remediation: an
786 experimental investigation with aquatic macrophyte *Lemna minor*. *J. Environ. Sci.*
787 *Eng.* 53, 199-202.

- 788 20. Lam, E., Appenroth, K.J., Michael, T., Mori, K., Fakhoorian, T., 2014.
789 Duckweed in bloom: the 2nd International Conference on Duckweed Research
790 and Applications heralds the return of a plant model for plant biology. *Plant. Mol.*
791 *Biol.* 84, 737-42.
- 792 21. Mkandawire, M.; Dudel, E.G. 2007 Are *Lemna* spp. Effective phytoremediation
793 agents? *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 1(1): 56-71.
- 794 22. Morant, M., Bak, S., Møller, B.L., Werck-Reichhart, D., 2003. Plant
795 cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation.
796 *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 151-62. Jun;14(3):355.
- 797 23. Mulligan, R.M., Chory, J., Ecker, J.R., 1997. Signaling in plants. *Proc. Natl.*
798 *Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2793-5.
- 799 24. Muradov N, Fidalgo B, Gujar AC, T-Raissi A, 2010. Pyrolysis of fast-growing
800 aquatic biomass -*Lemna minor* (duckweed): Characterization of pyrolysis
801 products. *Bioresour Technol* 101(21):8424-8.
- 802 25. Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen-peroxide is scavenged by ascorbate-
803 specific peroxidase in spinach-chloroplasts. *Plant Cell. Physiol.* 22, 867-880.
- 804 26. Nodzynski, T., Feraru, M.I., Hirsch, S., De Rycke, R., Niculaes, C., Boerjan,
805 W., Van Leene, J., De Jaeger, G., Vanneste, S., Friml, J., 2013. Retromer
806 subunits VPS35A and VPS29 mediate prevacuolar compartment (PVC) function in
807 *Arabidopsis*. *Mol. Plant.* 6, 1849-62.
- 808 27. Oukarroum, A., Bussotti, F., Goltsev, V., Kalaji, H.M., 2015. Correlation
809 between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems
810 I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress. *Environ Exp Bot* 109:80-88.
- 811 28. Saini, S., Sharma, I., Kaur, N., Pati, P.K., 2013. Auxin: a master regulator in
812 plant root development. *Plant Cell. Rep.* 32, 741-57.

- 813 29. Savchenko, T.V., Zastrijnaja, O.M., Klimov, V.V., 2014 Oxylipins and plant
814 abiotic stress resistance. *Biochemistry (Mosc)*. 79, 362-75
- 815 30. Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction
816 and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J.*
817 *Bot.* 50, 199–204.
- 818 31. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2006. In-gel
819 digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat*
820 *Protoc.* 1, 2856-60.
- 821 32. Silva, F.A.S.; Azevedo, C.A.V., 2006. A New Version of The Assistat-Statistical
822 Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN
823 AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais Orlando: American Society of
824 Agricultural and Biological Engineers, pp. 393-396.
- 825 33. Smart, C.C., Fleming, A.J., 1996. Hormonal and environmental regulation of a
826 plant PDR5-like ABC transporter. *J. Biol. Chem.* 271, 19351-7.
- 827 34. Stitt, M., Zeeman, S.C., 2012. Starch turnover: pathways, regulation and role
828 in growth. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 15, 282-92.
- 829 35. Stomp, A.M., 2005. The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing.
830 *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 69-99.
- 831 36. Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M.,
832 Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2002. Important roles of drought- and
833 cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis*
834 *thaliana*. *Plant J.* 29, 417-26.
- 835 37. Timm, S., Florian, A., Fernie, A.R., Bauwe, H., 2016. The regulatory interplay
836 between photorespiration and photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 67, 2923-9.

- 837 38. Tripathy, B.C., Oelmüller, R., 2012. Reactive oxygen species generation and
838 signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 7, 1621-33.
- 839 39. Tuteja, N., Tran, N.Q., Dang, H.Q., Tuteja, R. 2011. Plant MCM proteins: role
840 in DNA replication and beyond. *Plant Mol. Biol.* 77, 537-45.
- 841 40. van der Biezen, E.A., Sun, J., Coleman, M.J., Bibb, M.J., Jones, J.D., 2000.
842 *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl*
843 *Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3747-52.
- 844 41. Vidaković-Cifrek, Ž., Tkalec, M., Šikić, S., Tolić, S., Lepeduš, H., 2015
845 Pevalek-Kozlina B. Growth and photosynthetic responses of *Lemna minor* L.
846 exposed to cadmium in combination with zinc or copper. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*
847 66, 141-52.
- 848 42. Wang, W., Li, R., Zhu, Q., Tang, X., Zhao, Q., 2016. Transcriptomic and
849 physiological analysis of common duckweed *Lemna minor* responses to NH₄(+)
850 toxicity. *BMC Plant. Biol.* 18;16:92. doi: 10.1186/s12870-016-0774-8.
- 851 43. Wang, W., Yang, C., Tang, X., Gu, X., Zhu, Q., Pan, K., Hu, Q., Ma, D., 2014
852 Effects of high ammonium level on biomass accumulation of common duckweed
853 *Lemna minor* L. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 14202-10
- 854 44. Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C.,
855 Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and
856 is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J.* 16, 4806-16.
- 857 45. Xu J, Zhao H, Stomp AM, Cheng JJ., 2012. The production of duckweed as a
858 source of biofuels. *Biofuels.* 3(5) 589-601.
- 859 46. Yu, C., Sun, C., Yu, L., Zhu, M., Xu, H., Zhao, J., Ma, Y., Zhou, G., 2014.
860 Comparative analysis of duckweed cultivation with sewage water and SH media

861 for production of fuel ethanol. PLoS One. 9(12):e115023. doi:
862 10.1371/journal.pone.0115023.

863 47. Zhao, H., Appenroth, K., Landesman, L., Salmeán, A.A., Lam, E., 2012.
864 Duckweed rising at Chengdu: summary of the 1st International Conference on
865 Duckweed Application and Research. Plant Mol. Biol. 78, 627-32.

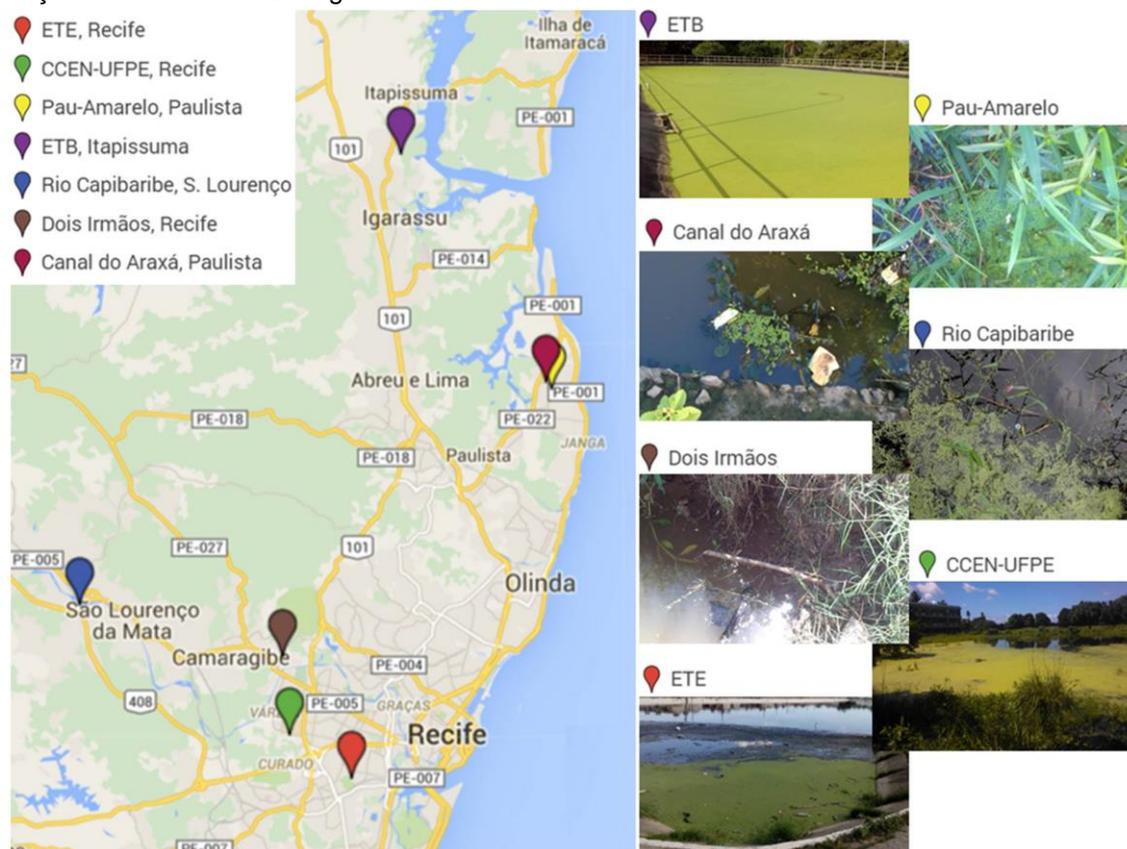
866 48. Ziegler, P., Adelman, K., Zimmer, S., Schmidt, C., Appenroth, K.J., 2015.
867 Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly
868 growing higher plants. Plant. Biol. (Stuttg). 17, Suppl 1:33-41. doi:
869 10.1111/plb.12184.

870

6 DISCUSSÃO GERAL

A importância de lentilhas-d'água para estudos de biologia e evolução de plantas é indiscutível. Atualmente, nove clones de lentilhas-d'água coletadas a partir de sete locais da região metropolitana de Recife (Figura 1) estão estabelecidos *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Embora nenhuma coleta tenha sido realizada em área de proteção ambiental, a autorização para coletas foi obtida junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Anexo A).

Figura 1 – Localização e registros dos pontos de coleta de lentilhas-d'água na região metropolitana de Recife, Pernambuco, Brasil. ETE: Estação de Tratamento de Esgoto; CCEN: Centro de Ciências Exatas e da Natureza; UFPE: Universidade Federal de Pernambuco; ETB: Estação de Tratamento Biológico.



Fonte: O autor.

O estabelecimento das populações clonais de lentilhas-d'água nativas viabilizou os estudos aqui apresentados. Além disso, considerando que o

potencial para fitorremediação de lentilhas-d'água pode ser melhorado a partir do uso de plantas nativas (Bergmann et al., 2000), este material contribuirá para o desenvolvimento de novos estudos.

Dentre as 37 espécies de Lemnaceae, as espécies do gênero *Lemna* têm sido extensivamente utilizadas para pesquisas moleculares, por apresentar facilidade de cultivo em laboratório, demonstrando seu potencial como organismo modelo para fisiologia, ecotoxicologia e evolução de plantas, o que justificou o sequenciamento do genoma (Van Hoeck et al., 2015).

De fato, a publicação das primeiras interpretações do genoma de *Lemna minor* lançou novos *insights* sobre seu potencial genético, mas também ressaltou a complexidade do gênero *Lemna*. Por exemplo, a variação do tamanho do genoma haploide de *Lemna minor* varia de 323 e 760 Mbp, reconhecendo a necessidade de avançar na compreensão das relações de sua estrutura genômica e das famílias gênicas conservadas entre espécies de *Lemna* (Van Hoeck et al., 2015).

Neste contexto, a relevante plasticidade fenotípica apresentada por clones de uma mesma espécie de *Lemna*, mais especificamente *Lemna aequinoctialis*, demonstrado no Capítulo I, eleva o nível de complexidade deste gênero, sendo observada relevante diversidade biológica em contraste com a baixa diversidade genética dos clones de *L. aequinoctialis*. Assim, o capítulo I revela que características fenotípicas de interesse, como crescimento e capacidade de fitorremediação, variam significativamente em nível clonal, sugerindo que a seleção de ecotipos de lentilhas-d'água pode melhorar sua aplicação biotecnológica.

O meio SH é recomendado para o cultivo de lentilhas-d'água fornecendo concentrações otimizadas de nutrientes (Yu et al., 2014). Entretanto, o capítulo I relata pela primeira vez que meio SH 0,5X melhora o crescimento de lentilhas-d'água e que, comparativamente ao meio SH completo, permite a diferenciação dos clones, contribuindo para a seleção de potenciais genótipos para aplicações de interesse. A caracterização preliminar *in vitro* foi relatada como um método atraente de seleção, que permite reduzir os custos e os problemas do dimensionamento de experimentos em campo (Bergmann et al., 2000).

Dentre os clones caracterizados, *L. aequinoctialis* clone M1 mostrou-se adaptado ao cultivo em água residual, exibindo elevadas taxas de crescimento, inclusive em ensaios *ex vitro* a partir de esgoto diluído (dados não mostrados). Por isso, *L. aequinoctialis* clone M1, foi selecionado para análise proteômica (Capítulo II).

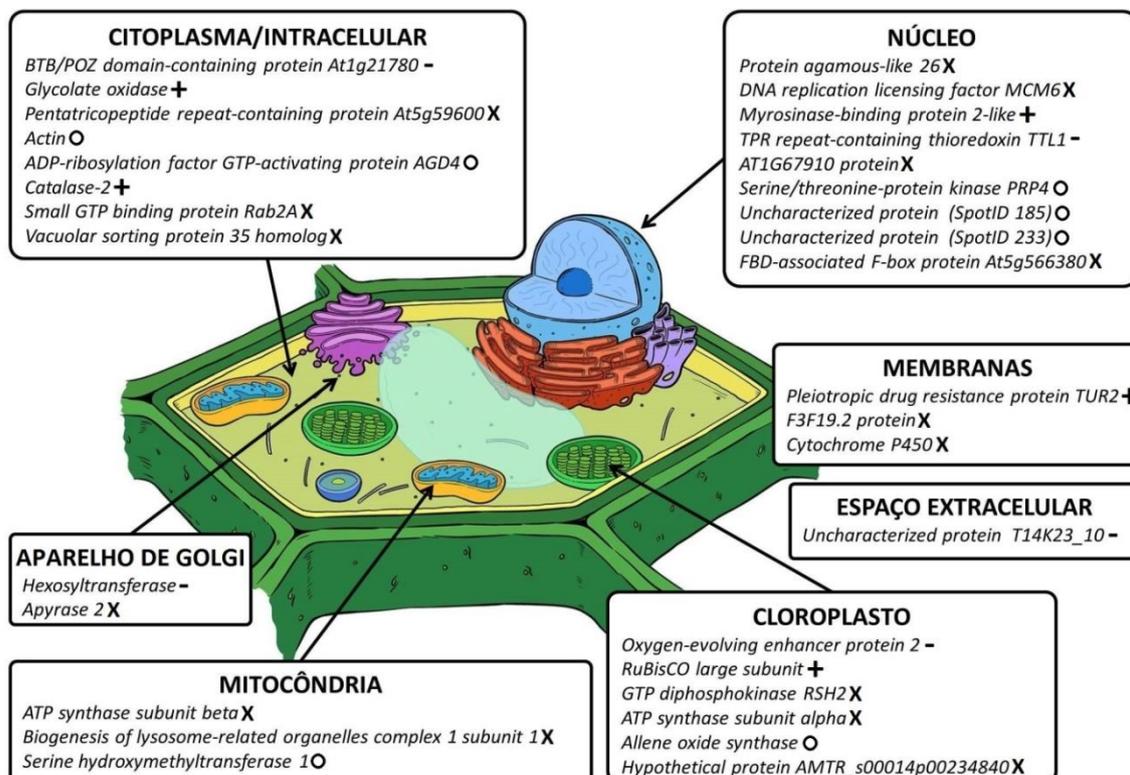
No capítulo II, surpreendentemente, a suplementação meio de cultivo SH 0,5X com água de esgoto (SW) induz o maior crescimento de *L. aequinoctialis* clone M1, suportando sua elevada produção de biomassa a partir de um rigoroso ajuste de seu metabolismo e sua fisiologia. O que justifica a escolha da abordagem proteômica para investigação de mecanismos moleculares associados à resposta global do organismo.

A análise proteômica é considerada uma análise aberta que permite a investigação das proteínas expressas em resposta à mudança das condições ambientais, resultando num perfil de resposta proteômica intimamente relacionado ao fenótipo observado para adaptação ou enfrentamento aos estímulos ambientais. Visto que, a resposta proteômica reflete a capacidade das plantas em lidar com a grande variedade de tensões ambientais, sendo, em sua

maioria, essencial para regulação da resposta ou do processo de adaptação, permitindo que as plantas se recuperem e sobrevivam ao estresse (Hakeem et al., 2012).

De fato, o proteoma diferencial de *L. aequinoctialis* clone M1 crescendo na presença de SW (Figura 2), revelou os principais processos biológicos regulados para manutenção do crescimento e adaptação da lentilha-d'água. Em geral, lentilhas-d'água são capazes de efetivar respostas de adaptação muito rapidamente, por isso, acreditamos que a investigação da regulação de expressão gênica por fatores epigenéticos, micro-RNAs, e elementos de transposição de lentilhas-d'água pode contribuir significativamente para avançar na compreensão de sua complexidade.

Figura 2 – Representação de modelo celular do proteoma diferencial de *Lemna aequinoctialis* clone M1 crescendo a partir de meio contendo água de esgoto (SH:SW), usando SH como referência. (o) Proteína detectada apenas em meio SH:SW; (x) Proteína detectada apenas em SH; (+) Proteína comum induzida em SH:SW (-) Proteína comum reprimida em SW.



Fonte: O autor.

Além disso, este estudo corroborou o potencial de aplicação de lentilhas-d'água para melhorar a qualidade de efluente de estação de tratamento de esgoto doméstico, como um sistema complementar ou natural de tratamento de efluentes, produzindo biomassa com potencial para bioenergia. Por exemplo, foi demonstrado que a partir da biomassa de uma lentilha-d'água nativa, cultivada em efluente, é possível atingir a produção de $140 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{ano}^{-1}$, com base no cenário pouco otimista de apenas 3% de retenção da biomassa após secagem. Este potencial pode ser aumentado em cerca de 10 vezes a partir cultivo em meio alternativo. No entanto, estudos que viabilizem a produção de bioetanol a partir de biomassa fresca, além de reduzir custos de processamento e manejo da biomassa, podem elevar significativamente esta produção.

Atualmente, a adição de SW ao meio de cultivo está sendo investigado no Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas por abordagem proteômica de larga escala. Além disso, está sendo concluída a investigação do proteoma diferencial de *L. aequinoctialis* clone M1 para comparação de SH vs SW (Apêndice A) e SW vs SH:SW (Apêndice B), que devido ao seu potencial para registro de patentes serão tecnicamente avaliados antes de sua ampla divulgação. Juntos, os três trabalhos proteômicos revelaram 213 DAPs, que serão analisados por abordagens estatísticas multivariadas, integrando dados bioquímicos e fisiológicos, para seleção de potenciais biomarcadores funcionais para seleção assistida ou melhoramento genético de lentilhas-d'água.

Portanto, o desenvolvimento do projeto viabilizou o estabelecimento *in vitro* de nove linhagens clonais de lentilhas-d'água nativa, que contribuirá para o desenvolvimento de pesquisas estratégicas, bem como sua continuidade, viabilizará a integração de dados proteômicos, transcriptômicos, genômicos,

bioquímicos e fisiológicos de lentilhas-d'água. Futuramente, a integração destes dados, permitirá a seleção de genótipos, genes e proteínas adequados as suas potenciais aplicações biotecnológicas.

7 CONCLUSÕES

- Os clones de *Lemna aequinoctialis* nativas da região metropolitana de Recife-PE apresentam baixa diversidade genética para sequência *atpF-atpH*, mas relevante diversidade biológica em nível clonal.
- O cultivo *in vitro* permite a avaliação de múltiplas características de interesse para seleção de genótipos com potencial biotecnológico;
- Lentilhas-d'água nativas podem ser utilizadas para melhoria da qualidade de efluente de ETE Mangueira, como sistema complementar, com relevante potencial para produção de bioetanol.
- A adição de água de esgoto (SW) ao meio de cultivo SH induziu maior crescimento da lentilhas-d'água, suportando a elevada produção de biomassa como relevante teor de amido.
- A análise proteômica foi capaz de revelar os principais processos biológicos associados à resposta de *L. aequinoctialis* clone M1 cultivado na presença de efluente.
- O metabolismo de auxina parece atuar na modulação da resposta de *L. aequinoctialis* clone M1 para adaptação ao meio contendo efluente.
- SW induziu o crescimento e desenvolvimento precoce do tecido radicular de *L. aequinoctialis* clone M1.
- O sucesso de *L. aequinoctialis* clone M1 pode estar associado a maior acúmulo de proteínas de defesa e resposta a estresses abióticos e ao rigoroso controle do metabolismo oxidativo.
- A indução da fotorrespiração contribuiu para manutenção do crescimento e para a homeostase do balanço redox de *L. aequinoctialis* clone M1 cultivado na presença de SW.

REFERÊNCIAS

- Aebersold R, Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422 (6928):198-207.
- Amorim HV, Lopes ML, de Castro Oliveira JV, Buckeridge MS, Goldman GH. (2011) Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol*. 91(5):1267-75.
- Appenroth KJ, Nickel G. (2010) Turion formation in *Spirodela polyrhiza*: the environmental signals that induce the developmental process in nature. *Physiol Plant*. 138(3):312-20.
- Appenroth KJ, Borisjuk N, Lam E. (2013a) Telling Duckweed Apart: Genotyping Technologies for the *Lemnaceae*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 19,1–10.
- Appenroth KJ, Palharini L, Ziegler P. (2013b) Low-molecular weight carbohydrates modulate dormancy and are required for post-germination growth in turions of *Spirodela polyrhiza*. *Plant Biol (Stuttg)*. 15(2):284-91.
- Appenroth KJ, Sree KS, Fakhoorian T, Lam E. (2015) Resurgence of duckweed research and applications: report from the 3rd International Duckweed Conference. *Plant Mol Biol.*, 89(6):647-54.
- Bartley MR, Spence DHN. (1987) Dormancy and propagation in helophytes and hydrophytes. *Arch Hydrobiol (Beih)*, 27:139–155.
- Bergmann BA, Cheng J, Classen J, Stomp AM. (2000) In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresour Technol*. 73(1): 13–20.
- Bertran K, Thomas C, Guo X, Bublot M, Pritchard N, Regan JT, Cox KM, Gasdaska JR, Dickey LF, Kapczynski DR, Swayne DE. (2015) Expression of H5 hemagglutinin vaccine antigen in common duckweed (*Lemna minor*) protects against H5N1 high pathogenicity avian influenza virus challenge in immunized chickens. *Vaccine*. 9;33(30):3456-62.
- Bog M, Baumbach H, Schween U, Hellwig F, Landolt E, Appenroth KJ. (2010) Genetic structure of the genus *Lemna* L. (*Lemnaceae*) as revealed by amplified fragment length polymorphism. *Planta.*, 232(3):609-19.
- Bokhari SH, Ahmad I, Mahmood-UI-Hassan M, Mohammad A. (2016) Phytoremediation potential of *Lemna minor* L. for heavy metals. *Int J Phytoremediation*. 18(1):25-32.
- Borisjuk N, Chu P, Gutierrez R, Zhang H, Acosta K, Friesen N, Sree KS, Garcia C, Appenroth KJ, Lam E. (2015) Assessment, validation and deployment strategy of a two-barcode protocol for facile genotyping of duckweed species. *Plant Biol (Stuttg)*. 17 Suppl 1:42-9.
- Campanella A, Muncrief R, Harold MP, Griffith DC, Whitton NM, Weber RS. (2012) Thermolysis of microalgae and duckweed in a CO₂-swept fixed-bed reactor: bio-oil yield and compositional effects. *Bioresour Technol*. 109:154-62.

- Cantó-Pastor A, Mollá-Morales A, Ernst E, Dahl W, Zhai J, Yan Y, Meyers BC, Shanklin J, Martienssen R. (2015) Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*. *Plant Biol (Stuttg)*. 17 Suppl 1:59-65.
- Chaudhary E, Sharma P (2014) Duckweed as ecofriendly tool for phytoremediation. *Int J Sci Res* 3(6):1615-1617.
- Cheng J, Bergmann BA, Classen JJ, Stomp AM, Howard JW. (2002) Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata*. *Bioresour Technol*. 81(1):81-5.
- Cui W, Cheng JJ. (2015) Growing duckweed for biofuel production: a review. *Plant Biol (Stuttg)*,17 Suppl 1:16-23.
- Cui WH, Xu JL, Cheng JJ, Stomp AM. (2011) Starch accumulation in duckweed for bioethanol production. *Biol Eng*. 3:187-197.
- Del-Campo Marín CM, Oron G. (2007) Boron removal by the duckweed *Lemna gibba*: a potential method for the remediation of boron-polluted waters. *Water Res*.41(20):4579-84.
- Fasahat P, Rahman S, Ratnam W. (2014) Genetic controls on starch amylose content in wheat and rice grains. *J Genet*. 93(1):279-92.
- Firsov A, Tarasenko I, Mitiouchkina T, Ismailova N, Shaloiko L, Vainstein A, Dolgov S. (2015) High-Yield Expression of M2e Peptide of Avian Influenza Virus H5N1 in Transgenic Duckweed Plants. *Mol Biotechnol*. 57(7):653-61.
- Gandikota M, Birkenbihl RP, Höhmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P. (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J*. 49(4):683-93.
- Ge X, Zhang N, Phillips GC, Xu J. (2012) Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. *Bioresour Technol*. 124:485-8.
- Goswami C, Majumder A, Misra AK, Bandyopadhyay K. (2014) Arsenic uptake by *Lemna minor* in hydroponic system. *Int J Phytoremediation*. 16(7-12):1221-7.
- Guendouz S, Khellaf N, Zerdaoui M, Ouchefoun M. (2013) Biosorption of synthetic dyes (Direct Red 89 and Reactive Green 12) as an ecological refining step in textile effluent treatment. *Environ Sci Pollut Res Int*. 20(6):3822-9.
- Hakeem KR, Chandna R, Ahmad P, Iqbal M, Ozturk M. (2012) Relevance of proteomic investigations in plant abiotic stress physiology. *OMICS*. 16(11):621-35.
- Huang M, Fang Y, Xiao Y, Sun J, Jin Y, Tao X, Ma X, He K, Zhao H. (2014) Proteomic analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation, *Indust Crops and Products*. 59:299-308.
- Huang M, Fang Y, Liu Y, Jin Y, Sun J, Tao X, Ma X, He K, Zhao H. (2015) Using proteomic analysis to investigate uniconazole-induced phytohormone variation and starch accumulation in duckweed (*Landoltia punctata*). *BMC Biotechnol*. 15;15:81.

- Khellaf N, Zerdaoui M. (2012) Development of a kinetic model for the removal of zinc using the aquatic macrophyte, *Lemna gibba* L. *Water Sci Technol.* 66(5):953-7.
- Korner S, Vermaat JE, Veenstra S. (2003) The capacity of duckweed to treat wastewater: ecological considerations for a sound design. *J Environ Qual.* 32:1583-1590.
- Kumar D, Asolekar SR, Sharma SK. (2015) Post-treatment and reuse of secondary effluents using natural treatment systems: the Indian practices. *Environ Monit Assess.* 187(10):612.
- Kuraishi MA, Sharma S. (2011) Wastewater pollution remediation: an experimental investigation with aquatic macrophyte *Lemna minor*. *J Environ Sci Eng.* 53(2):199-202.
- Lam E, Appenroth KJ, Michael T, Mori K, Fakhoorian T. (2014) Duckweed in bloom: the 2nd International Conference on Duckweed Research and Applications heralds the return of a plant model for plant biology. *Plant Mol Biol.* 84(6):737-42.
- Landolt E. (1986). The family of *Lemnaceae* – a monographic study, Vol.1. Stiftung Rubel, Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zurich, Switzerland.
- Landolt E, Kandeler R. (1987) Biosystematics investigation in the family of duckweeds (Lemnaceae). The family of the Lemnaceae: a monographic study. Vol. 2. Zurich: VeroffGeobotInst ETH.
- Landolt E. (1998). *Lemna yungensis*, a new duckweed species from rocks of the Andean Yungas in Bolivia. *Berichte des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Ru"bel, in Zürich* 64: 15–21.
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP. (2005) microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA.* 28;102(26):9412-7.
- LeBlanc S, Pick FR, Aranda-Rodriguez R. (2005) Allelopathic effects of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on duckweed, *Lemna gibba* L. *Environ Toxicol.* 20(1):67-73.
- Les DH, Crawford DJ. (1999). *Landoltia (Lemnaceae)*, a new genus of duckweeds. *Novon* 9: 530–533.
- Les DH, Landolt E, Crawford DJ. (1997). Systematics of Lemnaceae: inferences from micromolecular and morphological data. *Plant Systematics and Evolution* 204: 161–177.
- Les DH, Crawford DJ, Landolt E, Gabel JD, Kimball RT. (2002) Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. *Systematic Botany*, 27, 221–240.
- Liu Y, Fang Y, Huang M, Jin Y, Sun J, Tao X, Zhang G, He K, Zhao Y, Zhao H. (2015a) Uniconazole-induced starch accumulation in the bioenergy crop duckweed (*Landoltia punctata*) I: transcriptome analysis of the effects of uniconazole on chlorophyll and endogenous hormone biosynthesis. *Biotechnol Biofuels.* 2;8:57.

- Liu Y, Fang Y, Huang M, Jin Y, Sun J, Tao X, Zhang G, He K, Zhao Y, Zhao H. (2015b) Uniconazole-induced starch accumulation in the bioenergy crop duckweed (*Landoltia punctata*) II: transcriptome alterations of pathways involved in carbohydrate metabolism and endogenous hormone crosstalk. *Biotechnol Biofuels*. 11;8:64.
- Liu C, Dai Z, Sun H. (2017) Potential of duckweed (*Lemna minor*) for removal of nitrogen and phosphorus from water under salt stress. *J Environ Manage*. 1;187:497-503.
- Machado AI, Beretta M, Fragoso R, Duarte E. (2017) Overview of the state of the art of constructed wetlands for decentralized wastewater management in Brazil. *J Environ Manage*. 1;187:560-570.
- Mardanov AV, Ravin NV, Kuznetsov BB, Samigullin TH, Antonov AS, Kolganova, TV, Skyabin KG. (2008) Complete sequence of the duckweed (*Lemna minor*) chloroplast genome: structural organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *J Mol Evol*. 66(6):555-64.
- Mkandawire, M.; Dudel, E.G. (2007) Are *Lemna* spp. Effective phytoremediation agents? *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 1(1): 56-71.
- Mohedano RA, Costa RH, Tavares FA, Belli Filho P. (2012a) High nutrient removal rate from swine wastes and protein biomass production by full-scale duckweed ponds. *Bioresour Technol*. 112:98-104.
- Mohedano RA, Velho VF, Costa RH, Hofmann SM, Belli Filho P. (2012b) Nutrient recovery from swine waste and protein biomass production using duckweed ponds (*Landoltia punctata*): southern Brazil. *Water Sci Technol*. 65(11):2042-8.
- Muradov N, Fidalgo B, Gujar AC, T-Raissi A. (2010) Pyrolysis of fast-growing aquatic biomass - *Lemna minor* (duckweed): Characterization of pyrolysis products. *Bioresour Technol*. 101(21):8424-8.
- Nguyen LV, Cox KM, Ke JS, Peele CG, Dickey LF. (2012) Genetic engineering of a *Lemna* isoleucine auxotroph. *Transgenic Res*. 21(5):1071-83.
- Priya A, Avishek K, Pathak G. (2012) Assessing the potentials of *Lemna minor* in the treatment of domestic wastewater at pilot scale. *Environ Monit Assess*. 184(7):4301-7.
- Reinhold D, Vishwanathan S, Park JJ, Oh D, Michael Saunders F. (2010) Assessment of plant-driven removal of emerging organic pollutants by duckweed. *Chemosphere*. 80(7):687-92.
- Rival S, Wisniewski JP, Langlais A, Kaplan H, Freyssinet G, Vancanneyt G, Vunsh R, Perl A, Edelman M. (2008) Spirodela (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin. *Transgenic Res*. 17(4):503-13.
- Saha P, Banerjee A, Sarkar S. (2015) Phytoremediation Potential of Duckweed (*Lemna minor* L.) On Steel Wastewater. *Int J Phytoremediation*. 17(1-6):589-96.

- Silva JP, Ruiz JL, Peña MR, Lubberding H, Gijzen H. (2012) Influence of photoperiod on carbon dioxide and methane emissions from two pilot-scale stabilization ponds. *Water Sci Technol.* 66(9):1930-40.
- Sree KS, Adelmann K, Garcia C, Lam E, Appenroth KJ. (2015) Natural variance in salt tolerance and induction of starch accumulation in duckweeds. *Planta.* 241(6):1395-404.
- Stomp AM. (2005) The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing. *Biotechnol Annu Rev.* 11:69-99.
- Sun Y, Cheng JJ, Himmel ME, Skory CD, Adney WS, Thomas SR, Tisserat B, Nishimura Y, Yamamoto YT. (2007) Expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627. *Bioresour Technol.* 98(15):2866-72.
- Tang J, Zhang F, Cui W, Ma J. (2014). Genetic structure of duckweed population of *Spirodela*, *Landoltia* and *Lemna* from Lake Tai, China. *Planta.* 239(6):1299-307.
- Tao X, Fang Y, Xiao Y, Jin YL, Ma XR, Zhao Y, He KZ, Zhao H, Wang HY. (2013) Comparative transcriptome analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. *Biotechnol Biofuels.* 8;6(1):72.
- Tyers M and Mann M. (2003) From genomics to proteomics. *Nature.* 422(6928)193-7.
- Van Hoeck A, Horemans N, Monsieurs P, Cao HX, Vandenhove H, Blust R. (2015) The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. *Biotechnol Biofuels.* 25;8:188.
- 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. *J Proteomics.* 20;93:5-19.
- Vunsh R, Li J, Hanania U, Edelman M, Flaishman M, Perl A, Wisniewski JP, Freyssinet G. (2007) High expression of transgene protein in *Spirodela*. *Plant Cell Rep.* 26(9):1511-9.
- Wade VD (2010). "The Water Crisis: A Quest to Conserve Our Planet's Most Precious Resource." *Inquiries Journal/Student Pulse*, 2(11). Retrieved from <http://www.inquiriesjournal.com/a?id=321>
- Wang W, Messing J. (2012) Analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase expression during turions formation induced by abscisic acid in *Spirodela polyrhiza* (greater duckweed). *BMC Plant Biology*, 12, 5.
- Wang W, Messing J. (2015) Status of duckweed genomics and transcriptomics. *Plant Biol (Stuttg).* 17 Suppl 1:10-5.
- Wang W, Wu Y, Yan Y, Ermakova M, Kerstetter R, Messing J. (2010) DNA barcoding of the *Lemnaceae*, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biol.* 16;10:205.
- Wang W, Randall AK, Todd PM. (2011) Evolution of Genome Size in Duckweeds (*Lemnaceae*). *Journal of Botany*, vol. 2011, Article ID 570319, 9 pages.

- Wang W, Haberer G, Gundlach H, Gläßer C, Nussbaumer T, Luo MC, Lomsadze A, Borodovsky M, Kerstetter RA, Shanklin J, Byrant DW, Mockler TC, Appenroth KJ, Grimwood J, Jenkins J, Chow J, Choi C, Adam C, Cao XH, Fuchs J, Schubert I, Rokhsar D, Schmutz J, Michael TP, Mayer KF, Messing J. (2014a) The *Spirodela polyrhiza* genome reveals insights into its neotenus reduction fast growth and aquatic lifestyle. *Nat Commun.* 5:3311.
- Wang W, Yang C, Tang X, Gu X, Zhu Q, Pan K, Hu Q, Ma D. (2014b) Effects of high ammonium level on biomass accumulation of common duckweed *Lemna minor* L. *Environ Sci Pollut Res Int.* 21(24):14202-10.
- Weltje L, Brouwer AH, Verburg TG, Wolterbeek HT, de Goeij JJ. (2002) Accumulation and elimination of lanthanum by duckweed (*Lemna minor* L.) as influenced by organism growth and lanthanum sorption to glass. *Environ Toxicol Chem.* 21(7):1483-9.
- Wu K, Liu J, Wu Y, Chen Y, Li Q, Xiao X, Yang M. (2014) Pyrolysis characteristics and kinetics of aquatic biomass using thermogravimetric analyzer. *Bioresour Technol.* 63:18-25.
- Xu J, Shen G. (2011) Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresour Technol.* 102(2):848-53.
- Xu J, Zhao H, Stomp AM, Cheng JJ. (2012) The production of duckweed as a source of biofuels. *Biofuels* 3(5) 589-601(13).
- Xu JL, Cui WH, Cheng JJ, Stomp AM. (2011) Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosyst Eng.* 110:67-72.
- Xue H, Xiao Y, Jin Y, Li X, Fang Y, Zhao H, Zhao Y, Guan J. (2012) Genetic diversity and geographic differentiation analysis of duckweed using inter-simple sequence repeat markers. *Mol Biol Rep.* 39(1):547-54.
- Yin Y, Yu C, Yu L, Zhao J, Sun C, Ma Y, Zhou G. (2015) The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. *Bioresour Technol.* 187:84-90.
- Yu C, Sun C, Yu L, Zhu M, Xu H, Zhao J, Ma Y, Zhou G. (2014) Comparative analysis of duckweed cultivation with sewage water and SH media for production of fuel ethanol. *PLoS One.* 17;9(12):e115023.
- Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y. (2007) Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochem Biophys Res Commun.* 9;354(2):585-90.
- Zhao H, Appenroth K, Landesman L, Salmeán AA, Lam E. (2012) Duckweed rising at Chengdu: summary of the 1st International Conference on Duckweed Application and Research. *Plant Mol Biol.* 78(6):627-32.
- Zhao X, Moates GK, Wellner N, Collins SR, Coleman MJ, Waldron KW. (2014) Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). *Carbohydr Polym.* 13;111:410-8.
- Zhao X, Moates GK, Elliston A, Wilson DR, Coleman MJ, Waldron KW. (2015a) Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded duckweed: Improvement of the ethanol yield by increasing yeast titre. *Bioresour Technol.* 2;194:263-269.

Zhao Z, Shi HJ, Wang ML et al. (2015b) Effect of nitrogen and phosphorus deficiency on transcriptional regulation of genes encoding key enzymes of starch metabolism in duckweed (*Landoltia punctata*). *Plant Physiol Biochem.* 86:72-81.

**APÊNDICE A – TABELA DE ANOTAÇÃO DE TERMOS GO (*GENE ONTOLOGY*) E EC (*ENZYME CODE*) DE PROTEÍNAS
DIFERENCIAIS PARA COMPARAÇÃO SW VS. SH**

SpotID	SH:SW Ratio	ANOVA	Protein identification			p_{ca}/p_{obs}	M_{ca}/M_{obs}	Tag expression	GO terms associated	Enzyme?
			Score	% seq. coverage	e-value					
Common spots										
15	-1,629	0,01717	80	33	4,70E-02	8.78/5.36	31429/26337	DOWN	ND	-
16	-7,264	0,00384	53	18	1,50E-02	4.69/3.76	56857/25645	DOWN	C:chloroplast; F:protein binding	Yes
25	-1,771	0,02333	60	28	4,8E-02	8.10/4.36	29202/33519	DOWN	ND	-
35	-2,045	0,04216	66	27	1,1E-02	6.34/7.14	36921/37268	DOWN	P:response to salt stress; P:seed development; C:Golgi apparatus; C:nucleolus; C:vacuolar membrane; F:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity; F:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+) (non-phosphorylating) activity; C:chloroplast; P:response to heat; C:plasmodesma; F:copper ion binding; F:NAD binding; C:apoplast; C:cytosol; P:gluconeogenesis; F:zinc ion binding; P:glycolytic process; P:response to cadmium ion; P:response to hydrogen peroxide; C:mitochondrial envelope; P:defense response to bacterium; C:plasma membrane; P:response to sucrose; C:peroxisome; F:DNA binding; P:response to redox state; F:NADP binding; C:cell wall; P:oxidation-reduction process	Yes
60	-2,606	0,04260	62	34	2,2E-02	6,06/6.52	47099/48302	DOWN	C:chloroplast stroma; P:response to zinc ion; P:glyoxylate cycle; P:response to salt stress; C:chloroplast thylakoid; F:isocitrate dehydrogenase (NADP+) activity; P:isocitrate metabolic process; P:tricarboxylic acid cycle; P:response to cadmium ion; P:defense response to bacterium; C:plasma	Yes

									membrane; F:magnesium ion binding; C:peroxisome; C:plasmodesma; F:copper ion binding; F:NAD binding; C:mitochondrion; C:apoplast; P:NADP metabolic process; C:cytosol	
66	-1,614	0,00563	73	44	3,9E-03	6.24/5.76	46537/50376	DOWN	C:chloroplast stroma; P:response to zinc ion; P:glyoxylate cycle; P:response to salt stress; C:chloroplast thylakoid; F:isocitrate dehydrogenase (NADP+) activity; P:isocitrate metabolic process; P:tricarboxylic acid cycle; P:response to cadmium ion; P:defense response to bacterium; C:plasma membrane; F:magnesium ion binding; C:peroxisome; C:plasmodesma; F:copper ion binding; F:NAD binding; C:mitochondrion; C:apoplast; P:NADP metabolic process; C:cytosol	Yes
67	-1,881	0,00116	62	37	3,5E-02	9.01/5.91	28560/50820	DOWN	ND	-
70	-2,543	0,04443	61	32	3,2E-02	5.37/5.78	47343/54215	DOWN	C:exon-exon junction complex; P:RNA splicing; C:nuclear speck; C:Golgi apparatus; P:response to cadmium ion; P:rRNA processing; P:mRNA processing; C:nucleolus; C:vacuolar membrane; C:plant-type cell wall; P:translational initiation; C:plasma membrane; F:ATP-dependent RNA helicase activity; F:translation initiation factor activity; F:ATP binding; C:plasmodesma; F:protein binding; P:response to hypoxia; C:catalytic step 2 spliceosome; C:apoplast; P:regulation of gene expression; P:RNA secondary structure unwinding; C:cytosol	Yes
73	-2,232	0,04592	131	42	2,7E-10	6.32/3.16	50046/56246	DOWN	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes
84	-2,738	0,04858	59	22	4,7E-02	5.57/4.93	119174/63809	DOWN	P:mitotic spindle organization; C:kinesin complex; F:sequence-specific DNA binding; F:ATP-dependent microtubule motor activity, plus-end-directed; P:microtubule-based movement; P:cortical microtubule organization; C:plasma membrane; P:regulation of cell proliferation; F:microtubule binding; C:nucleus; F:ATP binding; P:regulation of gibberellic acid mediated signaling pathway;	Yes

									P:unidimensional cell growth; P:cytoskeleton-dependent intracellular transport; P:positive regulation of transcription, DNA-templated; P:mitotic cytokinesis; C:spindle; P:cellulose microfibril organization; C:cortical microtubule	
85	-2,958	0,02591	63	20	3,6E-02	9.03/5.78	63127/67300	DOWN	C:apoplast; F:binding; C:intracellular part; P:defense response to bacterium	No
96	-3,001	0,02127	59	25	4,5E-02	9.03/5.77	76980/86859	DOWN	P:response to salt stress; P:response to wounding; P:response to unfolded protein; P:response to light stimulus; P:auxin-activated signaling pathway; C:endoplasmic reticulum membrane; C:chloroplast outer membrane; P:response to oxidative stress; P:cellular response to heat; C:cytosol; P:response to inorganic substance; P:metabolic process; P:brassinosteroid mediated signaling pathway; P:cell redox homeostasis; P:positive regulation of abscisic acid-activated signaling pathway; C:nuclear envelope; P:protein targeting to mitochondrion; F:phosphoprotein phosphatase activity; P:abscisic acid-activated signaling pathway; C:mitochondrion; P:chaperone-mediated protein complex assembly; C:integral component of membrane; F:Hsp90 protein binding; P:leaf vascular tissue pattern formation; P:cellular response to cold	Yes
149	-1,699	0,00895	80	15	4,1E-02	8.63/4.85	61599/47835	DOWN	C:chloroplast; F:endonuclease activity; P:xylem and phloem pattern formation; P:leaf development; C:mitochondrion; P:sugar mediated signaling pathway; P:mitochondrial mRNA modification	Yes
165	-2,479	0,04617	63	29	4,4E-02	8.34/5.28	68258/63631	DOWN	P:embryo development ending in seed dormancy; C:Golgi apparatus; F:lipid binding; C:vacuolar membrane; F:protein histidine kinase binding; C:microtubule; C:chloroplast thylakoid membrane; F:GTP binding; P:clathrin-dependent endocytosis; C:plasmodesma; F:GTPase activity; C:cytosol; P:defense response to fungus; P:regulation of establishment of cell polarity; P:pollen maturation; P:peroxisome fission; P:xylem and phloem pattern formation; P:trichome branching; P:response to cadmium ion; P:root hair initiation; C:cell plate; C:plasma membrane; C:phragmoplast; P:mitochondrial fission; P:cell plate formation involved in plant-type cell wall biogenesis;	Yes

									C:peroxisome; C:cell cortex; C:mitochondrion; F:clathrin binding; C:clathrin-coated vesicle	
170	-2,934	0,03735	59	21	4,6E-02	6.54/5.69	51966/67289	DOWN	F:ATPase activity; F:guanosine-diphosphatase activity; F:inosine-diphosphatase activity; C:Golgi membrane; P:pollen germination; P:transport; C:plasma membrane; F:ATP binding; C:extracellular space; C:trans-Golgi network; F:calmodulin binding; C:endosome; F:uridine-diphosphatase activity; C:mitochondrion; C:integral component of membrane; C:cytoplasmic, membrane-bounded vesicle; P:purinergic receptor signaling pathway	Yes
Exclusive spots										
71	-	0,00485	67	30	7,2E-04	6.32/7.38	50046/56832	DOWN	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes
101	-	0,00046	63	38	2,5E-02	6.54/4.35	29295/19829	DOWN	ND	-
103	-	0,00007	64	30	3,0E-02	5.13/7.83	24183/23075	DOWN	P:cellular response to sorbitol; P:stomatal closure; F:phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate binding; P:cortical microtubule organization; P:cellular response to copper ion; C:vacuole; P:response to cytokinin; P:cellular response to iron ion; C:anchored component of plasma membrane; P:response to water deprivation; F:phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate binding; F:phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding; P:response to cold; P:cellular response to salt stress; C:chloroplast; C:plasmodesma; P:intracellular transport of virus; F:copper ion binding; F:calcium ion binding; P:cellular response to molecule of bacterial origin; P:positive regulation of microtubule depolymerization; P:negative regulation of microtubule polymerization; P:cellular response to magnesium starvation; F:phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate binding; C:cytoplasmic microtubule; P:defense response to bacterium; P:N-terminal protein myristoylation; F:microtubule binding; P:negative regulation of unidimensional cell growth; F:calmodulin binding;	No

109	-	0,00702	48	23	4,7E-02	8.82/7.47	68556/36910	DOWN	ND	P:response to calcium ion; P:cellular response to magnesium ion; P:cellular response to mannitol stimulus; P:cellular response to potassium ion	-
120	-	0,03785	92	34	2,4E-06	6.23/6.05	54402/55716	DOWN	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes	
122	-	0,00024	82	46	2,9E-02	4.99/7.52	22920/56482	DOWN	P:cellular response to sorbitol; P:stomatal closure; F:phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate binding; P:cortical microtubule organization; P:cellular response to copper ion; C:vacuole; P:response to cytokinin; P:cellular response to iron ion; C:anchored component of plasma membrane; P:response to water deprivation; F:phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate binding; F:phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding; P:response to cold; P:cellular response to salt stress; C:chloroplast; C:plasmodesma; P:intracellular transport of virus; F:copper ion binding; F:calcium ion binding; P:cellular response to molecule of bacterial origin; P:positive regulation of microtubule depolymerization; P:negative regulation of microtubule polymerization; P:cellular response to magnesium starvation; F:phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate binding; C:cytoplasmic microtubule; P:defense response to bacterium; P:N-terminal protein myristoylation; F:microtubule binding; P:negative regulation of unidimensional cell growth; F:calmodulin binding; P:response to calcium ion; P:cellular response to magnesium ion; P:cellular response to mannitol stimulus; P:cellular response to potassium ion	No	
194	-	0,00010	81	24	3,3E-02	8.43/4.78	45935/26844	UP	ND		-
197	-	0,03711	67	24	1,5E-02	9.02/5.97	63127/29539	UP	C:apoplast; F:binding; C:intracellular part; P:defense response to bacterium	No	
198	-	0,00022	62	21	5,0E-02	4.80/5.62	44829/29621	UP	ND		-

200	-	0,00001	67	18	7,6E-03	6.43/7.74	89645/29938	UP	F:ATP binding; C:cytoplasm; F:metal ion binding; C:membrane; F:ADP binding; P:metal ion transport; P:plant-type hypersensitive response	No
207	-	0,00589	94	33	1,4E-06	6.32/6.92	49976/32797	UP	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes
208	-	0,00451	61	18	2,9E-02	8.75/5.39	57713/34709	UP	F:beta-gentiobiose beta-glucosidase activity; P:response to salt stress; F:beta-L-arabinosidase activity; C:Golgi apparatus; C:extracellular region; C:plant-type cell wall; P:response to hormone; P:glycosyl compound metabolic process; C:plastid; F:beta-galactosidase activity; P:alkaloid biosynthetic process; P:carbohydrate metabolic process; C:plasmodesma; F:glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity; F:beta-D-fucosidase activity; C:mitochondrion; F:vomilenine glucosyltransferase activity; P:glucosinolate catabolic process; C:cytosol; C:cytoplasmic, membrane-bounded vesicle; F:raucafficine beta-glucosidase activity; F:scopolin beta-glucosidase activity	Yes
214	-	0,02012	65	21	2,9E-02	4.68/6.60	43791/39926	UP	ND	-
215	-	0,00099	61	40	2,9E-02	9.20/6.04	30999/40757	UP	C:extracellular region	No
216	-	0,00000	67	24	1,5E-02	9.02/7.37	63127/40952	UP	C:apoplast; F:binding; C:intracellular part; P:defense response to bacterium	No
217	-	0,02763	61	17	3,3E-02	6.21/5.97	59633/42772	UP	P:negative regulation of catalytic activity; F:alpha-amylase inhibitor activity; P:cellular response to abscisic acid stimulus; C:cytoplasmic, membrane-bounded vesicle; F:nutrient reservoir activity; P:seed maturation	No
219	-	0,00071	60	31	0,034	4.65/5.74	26346/42722	UP	C:PCNA complex; P:positive regulation of DNA repair; P:leading strand elongation; P:error-prone translesion synthesis; P:positive regulation of DNA replication; F:chromatin binding; P:mismatch repair; C:nucleolus; F:damaged DNA binding; F:DNA polymerase processivity	No

									factor activity; F:protein binding; P:cellular response to UV; C:cytosol; P:regulation of cell cycle	
222	-	0,02368	61	15	2,8E-02	7.44/6.17	93479/43517	UP	C:origin recognition complex; F:zinc ion binding; F:double-stranded methylated DNA binding; P:transcription, DNA-templated; P:DNA replication; P:double fertilization forming a zygote and endosperm; P:regulation of transcription, DNA-templated; F:chromatin binding; C:plastid; P:response to sucrose; C:nucleus; F:ATP binding; F:protein binding	No
229	-	0,00538	56	32	8,2E-03	6.29/7.68	50052/55112	UP	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes
232	-	0,01813	66	32	1,3E-02	8.13/8.10	57535/56675	UP	C:chloroplast stroma; F:pyridoxal phosphate binding; C:cytosolic ribosome; C:chloroplast thylakoid; P:L-serine metabolic process; P:photorespiration; P:pollen development; F:poly(U) RNA binding; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:mitochondrial respiratory chain complex I; C:plasmodesma; C:stromule; C:apoplast; P:glycine decarboxylation via glycine cleavage system; P:tetrahydrofolate interconversion; F:cobalt ion binding; F:zinc ion binding; P:polar nucleus fusion; F:glycine hydroxymethyltransferase activity; P:response to cadmium ion; P:circadian rhythm; P:plant-type hypersensitive response; C:plasma membrane; C:nucleus; F:protein binding; C:mitochondrial matrix	Yes
234	-	0,00047	66	64	1,2E-02	10.62/7.42	12612/59080	UP	ND	-
242	-	0,01285	59	9	4,8E-02	9.04/5.09	61576/94493	UP	P:RNA processing	No
244	-	0,04413	63	46	1,7E-03	8.84/5.73	19976/15501	UP	C:cytosolic ribosome; C:chloroplast ribulose bisphosphate carboxylase complex; P:photorespiration; P:chloroplast ribulose bisphosphate carboxylase complex biogenesis; P:response to blue light; F:monooxygenase activity; C:chloroplast thylakoid membrane; P:response to cold; C:thylakoid lumen; F:copper ion binding; P:response to far red light; C:chloroplast membrane; C:apoplast; P:reductive	Yes

									pentose-phosphate cycle; P:oxidation-reduction process; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity; P:response to red light	
251	-	0,03803	54	38	1,3E-02	9.15/4.87	25157/34738	UP	C:mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1); F:zinc ion binding; P:proton transport; C:chloroplast thylakoid; C:Golgi apparatus; P:ATP biosynthetic process; C:plastid envelope; C:plasma membrane; P:response to stress; P:photosynthetic electron transport chain; F:proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; F:cobalt ion binding	Yes
268	-	0,00003	60	33	4,9E-02	5.05/6.47	35152/105339	UP	ND	-
269	-	0,00236	84	55	1,8E-02	10.45/5.57	12104/29228	DOWN	C:cytosolic ribosome; F:3-oxo-arachidoyl-CoA synthase activity; F:3-oxo-lignoceroyl-CoA synthase activity; F:3-oxo-cerotoyl-CoA synthase activity; P:response to osmotic stress; P:response to wounding; C:extracellular region; P:very long-chain fatty acid metabolic process; F:fatty acid elongase activity; P:response to light stimulus; P:cuticle development; P:pollen tube development; C:endoplasmic reticulum membrane; C:nucleus; P:response to cold; P:unidimensional cell growth; C:integral component of membrane; P:fatty acid elongation; P:suberin biosynthetic process; P:wax biosynthetic process	Yes
271	-	0,00558	48	52	4,1E-02	6.96/6.42	23289/37275	DOWN	P:hyperosmotic salinity response; P:pollen development; P:regulation of vesicle-mediated transport; C:vacuolar membrane; P:intracellular protein transport; C:endoplasmic reticulum membrane; C:exocytic vesicle; F:GTP binding; C:chloroplast; C:endosome; C:plasmodesma; C:apical part of cell; F:GTPase activity; C:cytosol; C:trans-Golgi network membrane; F:kinase binding; C:endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membrane; C:pollen tube tip; P:pollen tube growth; P:small GTPase mediated signal transduction; P:response to cadmium ion; C:cell plate; C:plasma membrane; P:cell wall biogenesis; C:nucleus; P:ER to Golgi vesicle-mediated transport; P:regulation of pollen tube growth	Yes
272	-	0,00001	61	16	4,0E-02	9.95/6.01	36675/47289	DOWN	ND	-

274	-	0,00345	59	22	4,7E-02	8.89/7.47	50670/58113	DOWN	C:nucleus	No
277	-	0,00084	62	21	3,2E-02	9.14/7.11	42109/84142	DOWN	C:nucleus; F:DNA binding; F:transcription factor activity, sequence-specific DNA binding; P:transcription, DNA-templated; P:embryo development ending in seed dormancy; P:regulation of transcription, DNA-templated; F:protein dimerization activity; C:plasma membrane	No
281	-	0,00132	48	17	4,8E-02	8.71/6.88	60076/41055	DOWN	C:chloroplast stroma; P:photoperiodism, flowering; C:heterotetrameric ADPG pyrophosphorylase complex; F:ATP binding; P:glycogen biosynthetic process; C:glucose-1-phosphate adenylyltransferase complex; P:starch biosynthetic process; C:apoplast; C:amyloplast; C:chloroplast envelope; F:glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity	Yes
290	-	0,00048	60	22	5,4E-02	5.03/4.37	42951/19149	DOWN	C:late endosome membrane; C:retromer complex; C:cytosol; F:protein transporter activity; C:Golgi apparatus; P:endosome to lysosome transport; C:multivesicular body; P:intracellular protein transport; P:retrograde transport, endosome to Golgi	No

**APENDICE B – TABELA DE ANOTAÇÃO DE TERMOS GO (*GENE ONTOLOGY*) E EC (*ENZYME CODE*) DE PROTEÍNAS
DIFERENCIAIS PARA COMPARAÇÃO SW VS. SH:SW**

SpotID	SW:SH-SW Ratio	ANOVA	Protein identification			pI_{cal}/pI_{obs}	M_{cal}/M_{obs}	Tag expression	GO terms associated	Enzyme?
			Score	% seq. coverage	e-value					
Common spots										
17	1,5124	0,04355	73	3	8,7E-04	8.29/4.90	28364/24610	UP	C:chloroplast stroma; C:chloroplast photosystem II; F:calcium ion binding; C:apoplast; C:chloroplast envelope; C:photosystem II oxygen evolving complex; P:photosynthesis, light reaction; C:chloroplast thylakoid lumen; F:poly(U) RNA binding; C:extrinsic component of membrane; P:defense response to bacterium	No
22	-5,2960	0,03899	71	27	7,1E-03	8.68/3.67	29869/25404	DOWN	P:root epidermal cell differentiation; C:Golgi cisterna membrane; P:galactose biosynthetic process; P:pollen development; F:protein dimerization activity; C:plasma membrane; P:capsule polysaccharide biosynthetic process; P:xyloglucan biosynthetic process; F:UDP-glucose 4-epimerase activity; P:rhamnogalacturonan II biosynthetic process; C:mitochondrion; F:UDP-arabinose 4-epimerase activity; C:integral component of membrane; C:cytosol; P:arabinose biosynthetic process; P:rhamnogalacturonan I biosynthetic process; P:UDP-L-arabinose biosynthetic process	Yes
23	-1,8884	0,04088	65	38	2,5E-02	6.21/3.59	23736/25135	DOWN	P:protein transport; F:SNAP receptor activity; C:Golgi apparatus; F:SNARE binding; C:vacuole; C:intracellular organelle part; P:exocytosis; C:plasma membrane; C:nucleus; P:vesicle fusion; C:bounding membrane of organelle; C:integral component of membrane; C:cytosol; C:SNARE complex	No
29	-2,1524	0,04351	61	44	3,1E-02	6.52/5.18	34221/29396	DOWN	C:preprophase band; P:positive regulation of cell proliferation; P:cytokinesis by cell plate formation;	Yes

									<p>P:pollen development; P:protein autophosphorylation; P:regulation of meristem structural organization; P:regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity; P:hormone-mediated signaling pathway; F:ATP binding; P:response to cold; P:unidimensional cell growth; P:G2/M transition of mitotic cell cycle; C:cytosol; P:histone phosphorylation; P:stomatal complex formation; F:RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinase activity; C:cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex; P:regulation of meiotic nuclear division; P:asymmetric cell division; P:DNA endoreduplication; P:mitotic nuclear division; F:cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity; C:plasma membrane; P:cotyledon development; C:nucleus; C:cortical microtubule, transverse to long axis; F:cyclin binding; P:regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle</p>	
46	-2,4840	0,00188	83	29	2,2E-02	8.66/8.15	102318/34425	DOWN	<p>C:proteasome regulatory particle, base subcomplex; P:response to salt stress; P:response to wounding; P:pollen development; P:response to jasmonic acid; P:cell adhesion; C:vacuole; P:response to cytokinin; P:response to auxin; P:response to cold; C:chloroplast; P:response to heat; C:plasmodesma; P:glucosinolate catabolic process; C:cytosol; F:carbohydrate binding; P:response to misfolded protein; F:polyubiquitin binding; P:leaf senescence; P:root hair elongation; P:response to herbivore; P:defense response; P:cellular response to DNA damage stimulus; P:nitrile biosynthetic process; P:post-embryonic root development; P:proteasome core complex assembly; P:response to sucrose; C:nucleus; F:peptide receptor activity; P:proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process; P:response to abscisic acid; P:stamen formation; C:membrane; P:vegetative to reproductive phase transition of meristem; P:regulation of seed germination</p>	
52	-2,8256	0,03693	50	13	3,8E-02	8.17/6.62	163221/36966	DOWN	<p>F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; P:lead ion transport; P:response to ozone; P:response to jasmonic acid; P:terpenoid transport; P:abscisic acid transport; P:response to salicylic acid; C:plasma membrane; P:response to ethylene; F:ATP binding; P:drug transmembrane transport; F:protein</p>	Yes

binding; P:defense response to oomycetes;
C:mitochondrion; C:integral component of membrane

63	-1,9054	0,04123	91	38	3,7E-03	6.81/7.30	40993/39573	DOWN	ND	-
122	-2,2744	0,04115	59	22	4,7E-02	5.57/5.11	119174/63875	DOWN	C:chloroplast; P:RNA splicing; F:RNA binding; P:tRNA processing; P:mRNA processing	No
126	-4,0225	0,00543	63	20	3,6E-02	9.02/5.79	63127/67436	DOWN	C:apoplast; F:binding; C:intracellular part; P:defense response to bacterium	No
128	-4,4885	0,01518	69	48	6,3E-03	11.86/6.17	10926/66187	DOWN	C:mitochondrion	No
185	-4,1947	0,01045	86	38	9,8E-03	10.82/6.94	28441/39716	DOWN	C:chloroplast; F:RNA binding; F:protein binding; F:structural constituent of ribosome; P:embryo development ending in seed dormancy; P:cytoplasmic translation; C:Golgi apparatus; C:cytosolic large ribosomal subunit; C:nucleolus; C:vacuolar membrane; C:plasma membrane	No
Exclusive spots										
30	-	0,00004	80	50	4,5E-02	6.31/6.33	16796/29385	UP	ND	-
31	-	0,00001	82	27	3,0E-02	7.17/6.19	69758/30162	UP	P:regulation of defense response by callose deposition; P:regulation of root meristem growth; P:response to ozone; C:Golgi membrane; P:jasmonic acid and ethylene-dependent systemic resistance; C:plasma membrane; C:endoplasmic reticulum membrane; F:nucleotide binding; P:defense response to fungus, incompatible interaction; C:nucleus; P:defense response to bacterium, incompatible interaction; F:protein binding; P:defense response to oomycetes; C:mitochondrion; P:cellular response to UV; C:cytosol	No
70	-	0,02539	82	12	3,0E-02	8.40/5.09	124874/43629	UP	ND	-
78	-	0,00457	70	35	3,8E-04	6.32/7.09	50060/45911	UP	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process;	Yes

									F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	
82	-	0,00008	80	15	4,1E-02	8.63/4.82	61599/46672	UP	C:chloroplast; F:endonuclease activity; P:xylem and phloem pattern formation; P:leaf development; C:mitochondrion; P:sugar mediated signaling pathway; P:mitochondrial mRNA modification	Yes
85	-	0,00882	87	35	8,6E-03	6.17/5.31	33057/48598	UP	ND	-
88	-	0,00149	76	31	7,7E-05	6.32/7.09	49976/49750	UP	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes
109	-	0,01610	84	40	1,4E-05	5.57/5.51	55043/57015	UP	C:proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1); F:ATP binding; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; P:ATP synthesis coupled proton transport; C:chloroplast thylakoid membrane; F:proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Yes
111	-	0,03046	66	35	9,0E-03	5.95/5.43	59933/57041	UP	P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:chloroplast envelope; C:Golgi apparatus; P:response to cadmium ion; F:poly(U) RNA binding; C:nucleolus; C:mitochondrial proton-transporting ATP synthase, catalytic core; C:chloroplast thylakoid membrane; F:proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; F:ATP binding; C:mitochondrial respiratory chain complex I; F:protein binding; F:copper ion binding; C:cytosol; P:ATP synthesis coupled proton transport	Yes
155	-	0,00172	63	38	2,5E-02	6.54/4.39	29295/19644	DOWN	ND	-
159	-	0,00000	61	45	3,0E-02	11.78/5.61	12407/29661	DOWN	C:chloroplast; F:structural constituent of ribosome; C:cytosolic small ribosomal subunit; F:rRNA binding; P:translation	No
160	-	0,00007	62	38	5,0E-02	9.04/4.90	29485/34508	DOWN	C:thylakoid lumen; C:plastoglobule; C:chloroplast thylakoid membrane	No

162	-	0,00995	47	20	5,2E-02	8.94/5.84	37638/39235	DOWN	C:chloroplast stroma; P:response to salt stress; P:embryo development ending in seed dormancy; C:Golgi apparatus; P:cold acclimation; C:vacuolar membrane; P:response to cytokinin; C:chloroplast thylakoid membrane; P:response to heat; C:plasmodesma; C:cytosol; P:chloroplast-nucleus signaling pathway; P:response to cadmium ion; P:response to reactive oxygen species; C:plasma membrane; F:heme binding; P:hydrogen peroxide catabolic process; C:peroxisomal membrane; F:protein binding; F:metal ion binding; C:chloroplast membrane; C:cell wall; C:mitochondrion; C:integral component of membrane; P:cellular oxidant detoxification; P:oxidation-reduction process; P:hydrogen peroxide mediated signaling pathway; F:L-ascorbate peroxidase activity	Yes
172	-	0,00002	143	52	1,7E-11	6.14/6.82	51976/53675	DOWN	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes
175	-	0,00294	64	48	2,0E-02	11.86/6.03	10926/65524	DOWN	C:mitochondrion	No
199	-	0,00010	81	24	3,3E-02	8.43/4.78	45935/26844	UP	ND	-
203	-	0,03687	67	24	1,5E-02	9.02/5.97	63127/29539	UP	C:apoplast; F:binding; C:intracellular part; P:defense response to bacterium	No
204	-	0,00021	62	21	5,0E-02	4.80/5.62	44829/29621	UP	ND	
206	-	0,00001	67	18	7,6E-03	6.43/7.74	89645/29938	UP	F:ATP binding; C:cytoplasm; F:metal ion binding; C:membrane; F:ADP binding; P:metal ion transport; P:plant-type hypersensitive response	No
211	-	0,00580	55	19	9,9E-03	6.32/6.92	50122/32979	UP	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes

213	-	0,00444	61	18	2,9E-02	8.75/5.39	57713/34709	UP	F:beta-gentiobiose beta-glucosidase activity; P:response to salt stress; F:beta-L-arabinosidase activity; C:Golgi apparatus; C:extracellular region; C:plant-type cell wall; P:response to hormone; P:glycosyl compound metabolic process; C:plastid; F:beta-galactosidase activity; P:alkaloid biosynthetic process; P:carbohydrate metabolic process; C:plasmodesma; F:glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity; F:beta-D-fucosidase activity; C:mitochondrion; F:vomilenine glucosyltransferase activity; P:glucosinolate catabolic process; C:cytosol; C:cytoplasmic, membrane-bounded vesicle; F:raucaffricine beta-glucosidase activity; F:scopolin beta-glucosidase activity	Yes
217	-	0,02007	65	21	2,9E-02	4.68/6.60	43791/39926	UP	ND	-
218	-	0,00096	61	40	2,9E-02	9.20/6.04	30999/40757	UP	C:extracellular region	No
219	-	0,00000	67	24	1,5E-02	9.02/7.37	63127/40952	UP	C:apoplast; F:binding; C:intracellular part; P:defense response to bacterium	No
220	-	0,00125	60	35	5,2E-02	4.82/5.06	42849/41719	UP	P:biological_process; C:nucleus; C:chloroplast; C:cytoplasm; C:cellular_component; F:molecular_function	No
221	-	0,02742	61	17	3,3E-02	6.21/5.97	59633/42772	UP	P:negative regulation of catalytic activity; F:alpha-amylase inhibitor activity; P:cellular response to abscisic acid stimulus; C:cytoplasmic, membrane-bounded vesicle; F:nutrient reservoir activity; P:seed maturation	No
224	-	0,00069	60	31	0,034	4.65/5.74	26346/42722	UP	C:PCNA complex; P:positive regulation of DNA repair; P:leading strand elongation; P:error-prone translesion synthesis; P:positive regulation of DNA replication; F:chromatin binding; P:mismatch repair; C:nucleolus; F:damaged DNA binding; F:DNA polymerase processivity factor activity; F:protein binding; P:cellular response to UV; C:cytosol; P:regulation of cell cycle	No
227	-	0,02348	61	15	2,8E-02	7.44/6.17	93479/43517	UP	C:origin recognition complex; F:zinc ion binding; F:double-stranded methylated DNA binding; P:transcription, DNA-templated; P:DNA replication; P:double fertilization	No

									forming a zygote and endosperm; P:regulation of transcription, DNA-templated; F:chromatin binding; C:plastid; P:response to sucrose; C:nucleus; F:ATP binding; F:protein binding	
238	-	0,00084	66	64	1,2E-02	10.62/7.32	12612/58861	UP	ND	-
245	-	0,01494	72	26	2,4E-04	6.34/7.27	49178/50057	UP	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes
246	-	0,01269	59	9	4,8E-02	9.04/5.09	61576/94494	UP	P:RNA processing	No
253	-	0,03779	54	38	1,3E-02	9.15/4.87	25157/34738	UP	C:mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1); F:zinc ion binding; P:proton transport; C:chloroplast thylakoid; C:Golgi apparatus; P:ATP biosynthetic process; C:plastid envelope; C:plasma membrane; P:response to stress; P:photosynthetic electron transport chain; F:proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; F:cobalt ion binding	Yes
260	-	0,00504	68	40	5,9E-03	10.92/9.31	30315/34829	UP	C:chloroplast; F:structural constituent of ribosome; P:cytoplasmic translation; C:mitochondrion; C:cytosolic large ribosomal subunit; F:transferase activity; F:rRNA binding	No
269	-	0,00003	60	33	4,9E-02	5.05/6.47	35152/105339	UP	ND	-
272	-	0,01633	64	19	2,2E-02	8.05/6.05	77746/28889	DOWN	P:hyperosmotic salinity response; P:signal transduction; P:response to other organism; P:positive regulation of response to salt stress; P:protein autophosphorylation; F:protein serine/threonine kinase activity; F:binding; P:defense response; P:response to hormone; P:phyllome development; P:meristem structural organization; P:response to oxygen-containing compound; P:developmental process involved in reproduction; P:response to oxidative stress; C:intracellular membrane-bounded organelle; C:cytosol; P:response to lipid	Yes

274	-	0,00121	64	16	3,5E-02	9.45/5.71	90401/35779	DOWN	ND	-
									C:chloroplast stroma; P:response to salt stress; P:response to wounding; C:nucleolus; C:vacuole; P:response to cytokinin; P:response to auxin; P:cell division; F:ATP binding; C:plasmodesma; F:copper ion binding; P:response to far red light; C:apoplast; C:cytosol; P:response to red light; C:chloroplast envelope; P:response to high light intensity; P:root hair cell tip growth; F:structural constituent of cytoskeleton; P:seed germination; C:plasma membrane; C:cytoskeleton; F:protein binding; C:cell wall; C:mitochondrion; P:actin cytoskeleton organization	No
276	-	0,01587	63	33	1,8E-02	5.30/5.74	42017/40192	DOWN		
277	-	0,00367	59	35	4,8E-02	4.82/5.00	42849/41740	DOWN	P:biological_process; C:nucleus; C:chloroplast; C:cytoplasm; C:cellular_component; F:molecular_function	No
278	-	0,00116	51	52	2,4E-02	4.88/6.66	19490/45637	DOWN	ND	-
281	-	0,00095	108	42	5,3E-08	6.32/6.98	50060/54144	DOWN	F:nucleotide binding; F:magnesium ion binding; C:chloroplast; P:reductive pentose-phosphate cycle; P:photorespiration; P:oxidation-reduction process; F:monooxygenase activity; F:ribulose-bisphosphate carboxylase activity	Yes
286	-	0,00529	76	20	1,0E-03	6.14/5.68	87950/67501	DOWN	P:phloem or xylem histogenesis; P:cytoskeleton organization; P:activation of GTPase activity; P:embryo development ending in seed dormancy; P:xylem and phloem pattern formation; C:trans-Golgi network transport vesicle; F:GTPase activator activity; F:phosphatidylinositol binding; P:pollen development; P:endocytosis; C:plasma membrane; P:leaf morphogenesis; P:response to auxin; C:nucleus; C:endocytic vesicle; F:DNA binding; C:trans-Golgi network; C:endosome; F:protein binding; P:response to abscisic acid; F:metal ion binding; C:cytosol; P:floral organ abscission	No
291	-	0,00490	62	27	2,3E-02	4.88/5.24	53721/63934	DOWN	C:chloroplast stroma; C:cytosolic ribosome; P:embryo development ending in seed dormancy; C:Golgi apparatus; C:nucleolus; C:vacuolar membrane;	No

P:chloroplast organization; P:response to cytokinin;
 C:thylakoid; F:ATP binding; P:response to cold;
 P:inflammatory response; P:response to heat; P:cell
 death; P:systemic acquired resistance; F:copper ion
 binding; C:stromule; C:apoplast; C:chloroplast envelope;
 P:chaperone mediated protein folding requiring cofactor;
 P:response to cadmium ion; P:protein refolding; C:plasma
 membrane; P:mitochondrion organization; F:protein
 binding; C:mitochondrial matrix; P:chaperone-mediated
 protein complex assembly

F:oxygen binding; P:jasmonic acid biosynthetic process;
 P:response to wounding; P:response to jasmonic acid;
 F:allene oxide synthase activity; F:monooxygenase
 activity; C:chloroplast thylakoid membrane; P:oxylipin
 metabolic process; C:plastid inner membrane;
 P:epoxygenase P450 pathway; F:metal ion binding;
 C:chloroplast membrane; C:mitochondrion; P:defense
 response to fungus; C:plastoglobule; P:sterol metabolic
 process

308	-	0,00026	53	30	1,6E-02	8.11/5.90	53012/46510	DOWN		No
316	-	0,00763	65	84	2,7E-02	10.94/7.23	5686/59081	DOWN	ND	-

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL VEGETAL



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 49243-1	Data da Emissão: 12/05/2015 10:51
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: ADAUTO GOMES BARBOSA NETO	CPF: 066.066.224-84
---------------------------------	---------------------

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	GENERO	Lemna

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 86924914



Página 1/1

CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO

Adauto Gomes Barbosa Neto

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Adauto Gomes Barbosa Neto
Filiação JOZEILDO GOMES BARBOSA e MARIA JOSE RAMOS DE SOUZA
Nascimento 23/11/1987 - CAMARAGIBE/PE - Brasil
Carteira de Identidade 6352120 SDS - PE - 15/09/2005
CPF 066.066.224-84

Endereço residencial RUA EXP. CONSTANTINO AVELINO DE SÁ, 242 - BL-C, CS-101
 CAPIBARIBE - São Lourenço da Mata
 54740-660, PE - Brasil
 Telefone: 081 35254812

Endereço eletrônico E-mail para contato : nettobiologo@hotmail.com
 E-mail alternativo nettobiologo@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Doutorado em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: ANÁLISE PROTEÔMICA E BIOTECNOLÓGICA DE LEMNÁCEAS
 PARA PRODUÇÃO PILOTO DE BIOMASSA E BIOETANOL
 Orientador: TERCILIO CALSA JUNIOR
- 2011 - 2013** Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada.
 Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
 Título: Análise Proteômica de *Dekkera bruxellensis* associada a assimilação de
 nitrato e de amônio em aerobiose, Ano de obtenção: 2013
 Orientador: Tercilio Calsa Junior
 Co-orientador: Marcos Antônio de Moraes Junior
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2006 - 2010** Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.
 Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, Recife, Brasil
-

Formação complementar

- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Proteômica como ferramenta analítica para
 biossegurança de plantas GM. (Carga horária: 40h).
 CENTRO BRASILEIRO-ARGENTINO DE BIOTECNOLOGIA, CBAB, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Proteômica e Espectrometria de Massas. (Carga
 horária: 20h).
 Instituto de Bioinformática e Biotecnologia, I2BIO, Sao Paulo, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Utilization of Nanoparticles In Proteomics And Pro.
 (Carga horária: 6h).
 International Congress on Analytical Proteomics, ICAP, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estágio à Docência (Genética Humana) 2014.1 , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio à Docência (30 h) na Disciplina Genética Humana do Centro de Biociências (UFPE), sob supervisão da Profa. Dra. Mônica Carvalho.
- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estágio à Docência (Genética Humana) 2014.2, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio à Docência (30 h) na Disciplina Genética Humana do Centro de Biociências (UFPE), sob supervisão da Profa. Dra. Mônica Carvalho.
- 2013 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: ESTUDANTE DE DOUTORADO - PPGG , Carga horária: 40, Regime: Integral

2. Colégio Agrícola Dom Agostinho Ikas – CODAI/UFRPE

Vínculo institucional

- 2015 - 2015** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Tutor EAD (Microbiologia Geral - 80 h) , Carga horária: 10, Regime: Parcial
- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Tutor EAD (Microbiologia Aplicada - 80 h) , Carga horária: 10, Regime: Parcial
- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Tutor EAD (Microbiologia Geral - 80 h) , Carga horária: 10, Regime: Parcial
- 2013 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Tutor Virtual (Microbiologia Aplicada - 80 h) , Carga horária: 10, Regime: Parcial
- 2013 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Tutor EAD (Microbiologia Aplicada - 80 h) , Carga horária: 10, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2013 - Atual** Análise proteômica de lemnáceas associada à produção de biomassa e bioenergia
- 2011 - 2014** Análise proteômica da resposta ao estresse por radiação ultravioleta e seca em cana-de-açúcar (Saccharum spp.)

Prêmios e títulos

- 2016** Jovem Geneticista: Genética, Evolução e Melhoramento de Plantas (Menção honrosa), XXI Encontro de Genética do Nordeste
- 2013** III JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA - PAINEL, DEPT. GENÉTICA/CCB/UFPE
- 2012** Premiação da 14ª Jornada de Iniciação Científica (PIBIC CATÓLICA/CNPq/FACEPE) - Área: Ciências Biológicas, UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO

- 2012** Premiação da 14ª Jornada de Iniciação Científica (PIBIC CATÓLICA/CNPq/FACEPE) - Área: Geral, UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
- 2011** Prêmio Jovem Pesquisador, CCBS/UNICAP (I CONABIO)
- 2010** III SIMPÓSIO NORDESTINO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO - CCBS
- 2009** II SIMPÓSIO NORDESTINO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO-CCBS

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Neto, Adauto Gomes Barbosa**; PESTANA-CALSA, MARIA CLARA; DE MORAIS, MARCOS ANTONIO; CALSA, TERCILIO. Proteome responses to nitrate in bioethanol production contaminant *Dekkera bruxellensis*. *Journal of Proteomics (Print)*. , p.104 - 111, 2014.
2. DUTRA, EMMANUEL D.; **Neto, Adauto Gomes Barbosa**; SOUZA, RAFAEL BARROS; MORAIS JUNIOR, MARCOS ANTONIO; TABOSA, JOSE NILDO; MENEZES, RÔMULO SIMÕES CEZAR. Ethanol Production from the Stem Juice of Different Sweet Sorghum Cultivars in the State of Pernambuco, Northeast of Brazil. *Sugar Tech.* , p.316 - 321, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. LEITE, A. L.; SANTOS, F. J. A. L.; **BARBOSA NETO, A. G.**; BRASILEIRO, B. T. R. V. Análise de intervenção microbiológica em unidade industrial produtora de bioetanol In: I CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2013, RECIFE. **I CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.** , 2013.
2. SILVA, A. C. P.; LEITE, A. L.; SANTOS, F. J. A. L.; LIMA, M. C. S.; **BARBOSA NETO, A. G.**; BRASILEIRO, B. T. R. V. Identificação das variações alélicas de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação industrial In: I CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2013, RECIFE. **I CONGRESSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.** , 2013.
3. LIMA, M. C. S.; SANTOS, F. J. A. L.; LEITE, A. L.; **BARBOSA NETO, A. G.**; BRASILEIRO, B. T. R. V. Influência do reciclo de fermento na capacidade fermentescível de melaço In: I CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2013, RECIFE. **I CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.** , 2013.
4. CAVALCANTI, R. F. N.; **BARBOSA NETO, A. G.**; PESTANA-CALSA, M. C.; GUSMAO, N. B.; SILVA, F. C. A.; CALSA JUNIOR, T. Plasticidade fenotípica de *Rhodotorula aurantiaca* na presença de combustíveis fósseis In: I CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2013, RECIFE. **I CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.** , 2013.
5. MANSO, T. C.; CAVALCANTI, R. F. N.; **BARBOSA NETO, A. G.**; CALSA JUNIOR, T. Predição In silico da estrutura 3D da catalase de cana-de-açúcar In: I CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2013, RECIFE. **I CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.** , 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **BARBOSA NETO, A. G.**; MORAIS, M. B.; CALSA JUNIOR, T. Avaliação da plasticidade fenotípica de *Lemna aquinoctialis* (L.) para fitorremediação e produção de bioenergia In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife-PE. **XXI Encontro de Genética do Nordeste.** , 2016.

2. **BARBOSA NETO, A. G.**; MORAIS, M. B.; CALSA JUNIOR, T. Perfil proteômico de *Lemna aequinoctialis* (L.) cultivada em meio SH e efluente de estação de tratamento de esgoto In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife-PE. **XXI Encontro de Genética do Nordeste**. , 2016.
3. MORAIS, M. B.; **BARBOSA NETO, A. G.**; WILLADINO, L. G.; CALSA JUNIOR, T. Identificação de proteínas de lentilha-d'água (*Lemna* sp.) cultivada in vitro sob light-emitting diode (LED) In: XV Brazilian Congress on Plant Physiology, 2015, Foz do Iguaçu-PR. **XV Brazilian Congress on Plant Physiology/1st Brazilian-Israeli Plant Science Conference**. , 2015.
4. MORAIS, M. B.; **BARBOSA NETO, A. G.**; VASCONCELOS, S. L.; WILLADINO, L. G.; CALSA JUNIOR, T. Metabolismo oxidativo de isolados de lentilhas-d'água (*Lemna* sp.) cultivadas in vitro. In: XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2015, Recife-PE. **XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (XV JEPEX)**. , 2015.
5. SOUZA, A. E. R.; SOUZA, J. M.; **BARBOSA NETO, A. G.**; SILVA, F. C. A.; Pestana-Calsa, MC; CALSA JUNIOR, T. Cell wall proteomics in sugarcane under simultaneous ultraviolet-B radiation and drought stresses. In: Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference (BBEST), 2014, Búzios-RJ. **2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference (BBEST)**. , 2014.
6. ALMEIDA, R. R.; **BARBOSA NETO, A. G.**; SILVA, F. C. A.; Pestana-Calsa, MC; CALSA JUNIOR, T. Differential proteome analysis of sugarcane inoculated with nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* In: Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference (BBEST), 2014, Búzios-RJ. **2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference (BBEST)**. , 2014.
7. SOUZA, A. E. R.; MARTINS, P. G. S.; SOUZA, J. M.; **BARBOSA NETO, A. G.**; CALSA JUNIOR, T. Identificação de proteínas de parede celular e processos biológicos envolvidos na cana-de-açúcar submetida a estresse de radiação ultravioleta B e seca In: 20º Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande - PB. **XX ENGINE**. , 2014.
8. **BARBOSA NETO, A. G.**; SOUZA, G. H. M. F.; CALSA JUNIOR, T. Protein expression profile associated with Glycolysis pathway in response to nitrate assimilation in *Dekkera bruxellensis* In: 20º Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande - PB. **XX ENGINE**. , 2014.
9. SOUZA, A. E. R.; SOUZA, J. M.; **BARBOSA NETO, A. G.**; SILVA, F. C. A.; PESTANA-CALSA, MARIA CLARA; CALSA JUNIOR, T. Sugarcane cell wall proteome response to high ultraviolet-B radiation stress In: 1st INPPO World Congress, 2014, Hamburg, Germany. **1st INPPO World Congress on Plant Proteomics**. , 2014.
10. **BARBOSA NETO, A. G.**; MORAIS, M. B.; CALSA JUNIOR, T. 2-DE profiling of duckweed (*Lemna* sp.) proteome exposed to light-emitting diode (LED) In: 20º Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande - PB. **XX ENGINE**. , 2014.
11. **BARBOSA NETO, A. G.**; SILVA, V. C.; MORAIS JUNIOR, M. A.; CALSA JUNIOR, T. Identification of reference proteins for *Dekkera bruxellensis* 2D-PAGE profiling using MALDI-ToF/ToF In: 3rd International Congress on Analytical Proteomics, 2013, SÃO PEDRO. **International Congress on Analytical Proteomics**. , 2013.
12. **BARBOSA NETO, A. G.**; SILVA, P.K.N.; SILVA, V. C.; MORAIS JUNIOR, M. A.; CALSA JUNIOR, T. Proteomics of *Dekkera bruxellensis* on nitrate In: 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, 2013, Frankfurt, Germany. **Yeast (DOI:10.1002/yea.2973)**. Wiley, 2013. v.30. p.163 - 163

Apresentação de trabalho e palestra

1. **BARBOSA NETO, A. G. Proteômica de leveduras**, 2014. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

2. **BARBOSA NETO, A. G.**; SILVA, V. C.; Marcos Morais Jr.; Calsa Jr., T **Identification of reference proteins for Dekkera bruxellensis 2D-PAGE profiling using MALDI-ToF/ToF**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

3. **BARBOSA NETO, A. G.**; SILVA, P.K.N.; SILVA, V. C.; Marcos Morais Jr.; Calsa Jr., T **Proteomics of Dekkera bruxellensis on nitrate**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **Neto, Adauto Gomes Barbosa**

Biologia Molecular - Conceitos e Técnicas, 2014. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. ANGELA FRANCISCA DA SILVA. **Atividades antrópicas e contaminação das águas do rio Capibaribe em São Lourenço da Mata-PE**. 2014. Monografia (GESTÃO AMBIENTAL COM ÊNFASE EM ZONA COSTEIRA) - Fundação de Ensino Superior de Olinda

Iniciação científica

1. ADY LUNA LEITE. **Avaliação da Capacidade Fermentescível de Hidrolisados de Substratos Amiláceos e Lignocelulósicos para produção de bioetanol (CO-ORIENTADOR)**. 2014. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Católica de Pernambuco

2. FELIPE JOSÉ ALDES DE LIMA SANTOS. **Isolamento e Caracterização fisiológica de leveduras com potencial fermentativo para produção de bioetanol a partir de substratos alternativos (CO-ORIENTADOR)**. 2014. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Católica de Pernambuco

Eventos

Participação em eventos

1. **XXI Encontro de Genética do Nordeste**, 2016. (Encontro) Avaliação da plasticidade fenotípica de Lemna aequinoctialis (L.) para fitorremediação e produção de bioenergia.

2. **V Jornada de Pós-graduação em Genética**, 2015. (Encontro) Identificação de acessos de lentilhas-d'água isoladas na Região Metropolitana de Recife-PE.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **20º Encontro de Genética do Nordeste**, 2014. (Encontro) Protein expression profile associated with Glycolysis pathway in response to nitrate assimilation in Dekkera bruxellensis.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **3rd International Congress on Analytical Proteomics**, 2013. (Congresso) Identification of reference proteins for Dekkera bruxellensis 2D-PAGE profiling using MALDI-ToF/ToF.

5. Avaliador no(a) **4ª Jornada de Metodologia e Iniciação Científica UNINASSAU**, 2013. (Encontro) Avaliador de apresentação de pôster de iniciação científica de estudantes de engenharia ambiental.

6. Conferencista no(a) **SIMPÓSIO DE GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA (SIGEBIO)**, 2013. (Simpósio) Palestra: Proteômica de leveduras.

Organização de evento

1. **BARBOSA NETO, A. G.**; BRASILEIRO, B. T. R. V. **I CONGRESSO INTERNACIONAL DE**

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2013. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1. **BARBOSA NETO, A. G.** Participação em banca de ANGELA FRANCISCA DA SILVA. **Atividades antrópicas e contaminação das águas do rio Capibaribe em São Lourenço da Mata-PE**, 2014 (GESTÃO AMBIENTAL COM ÊNFASE EM ZONA COSTEIRA) Fundação de Ensino Superior de Olinda
2. **BARBOSA NETO, A. G.** Participação em banca de ARIANA MELO SALES. **Controle da qualidade do ar em ambientes hospitalares**, 2013 (Especialização em Gestão Ambiental) Universidade de Pernambuco