

CARLA QUINHONES GODOY SOARES

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL E CARACTERIZAÇÃO
FISIOLÓGICA DE DOIS CLONES DE *Coffea canephora* SOB
DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós- Graduação
em Fisiologia Vegetal, para obtenção do
título de “*Magister Scientiae*”

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S676p
2008

Soares, Carla Quinhones Godoy, 1981-
Proteômica diferencial e caracterização fisiológica
de dois clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico
/ Carla Quinhones Godoy Soares. – Viçosa, MG, 2008.
98f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Andréa Miyasaka de Almeida.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Déficit hídrico. 2. Estresse hídrico. 3. Espectrometria
de massa. 4. Café Condições hídricas. 5. Proteínas
6. *Coffea canephora*. 7. Fisiologia vegetal. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2

CARLA QUINHONES GODOY SOARES

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL E CARACTERIZAÇÃO
FISIOLÓGICA DE DOIS CLONES DE *Coffea canephora* SOB
DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”

APROVADA: 13 de junho de 2008.

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Co- orientador)

Prof. Fábio Murilo DaMatta
(Co- orientador)

Dr. Richard Hemmi Valente

Dr. Rogério Ferreira Ribas

Prof^a. Andréa Miyasaka de Almeida
(Orientador)

Aos meus pais Tadeu e Fátima,

ao meu irmão Matheus,

DEDICO E OFEREÇO

" Transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobrir como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar onde quer que seja, não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer."

Amyr Klink

"Deus, dai-nos a força para ajudar o progresso, a fim de subirmos até vós. Dai-nos a caridade pura. Dai-nos a fé e a razão. Dai-nos a simplicidade que fará de nossas almas o espelho onde se refletirá a vossa divina e santa imagem."

Prece de Cáritas

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e pela fé.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, pelo financiamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio através da concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV), pela formação propiciada através do curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

A minha orientadora Prof^a. Andréa Miyasaka de Almeida, pela confiança e orientação. Muitas foram as dificuldades, muitas foram as superações. Obrigada por me ensinar que não existem limites para quem quer aprender.

Aos meus co-orientadores Prof. Marcelo Ehlers Loureiro e Prof. Fábio Murilo DaMatta, pela co-orientação e pelas sugestões durante a realização desta tese. Em especial ao Prof. Marcelo Ehlers Loureiro, pelo apoio, e por me ensinar a vibrar a cada resultado alcançado.

A Prof^a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela confiança e utilização de seu laboratório.

Ao Dr. Richard Hemmi Valente e ao PhD. Jonas Enrique Aguilar Perales, por permitirem a realização de parte desta tese no Laboratório de Toxinologia da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ). Em especial ao Dr. Richard Hemmi Valente, pelos ensinamentos em espectrometria de massa, pela confiança e por não medir esforços em me ajudar.

Ao Dr. Rogério Ferreira Ribas, pela ajuda nas análises dos experimentos do segundo capítulo e pelas sugestões.

Ao Dr. André Teixeira da Silva Ferreira e à Giselle Villa Flor Brunoro, pela ajuda durante a realização de parte desta tese na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Ao Prof. Paulo H. P. Peixoto, por me iniciar no meio científico. Obrigada pelo carinho e confiança.

Ao Ms. Breno Lourenzzo Salgado Guimarães e Mauricio Arthur Vieira, pelas análises do primeiro capítulo.

À Dra. Claudine Marcia Carvalho, pela dedicação e companhia agradável no laboratório.

Ao Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos, pelas sugestões no primeiro capítulo desta tese.

À Maria Amélia, pesquisadora no Incaper, pela concessão de mudas para o experimento.

Aos colegas, Werner Antunes, Danilo Daloso e Marcelo Pompelli, Giselle Camargo, Valdir Diola, Adriano Lucheta, pelos inúmeros auxílios durante a realização deste trabalho. Em especial ao Marcelo Pompelli e Werner Antunes, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos alunos Samuel, Eduardo, Ezequiel, Sabrina, Rita, Ricardo, pela ajuda na realização dos experimentos do segundo capítulo desta tese. Em especial para Samuel e Ezequiel pela dedicação.

Aos alunos de iniciação científica Eduardo A. Soares e Sabrina H. Araújo, sem vocês essa etapa teria, com certeza, sido mais árdua. Obrigada, por tudo e por contribuírem para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus pais Tadeu e Fátima, e ao meu irmão Matheus, pela força e amor incondicional. Pelo apoio e carinho nas horas mais difíceis.

Ao meu namorado Ricardo Amorim, pelo amor, carinho, companheirismo. Pela paciência nas horas mais difíceis durante a realização deste trabalho.

Aos meus familiares Ilza, Edson e Luciano Staneck, por não medirem esforços em me ajudar e pelo carinho.

Às amigas Priscila Sequetto, Daniela Ferraz, Patrícia Cunha, Daniela Neves, por serem irmãs que deus me permitiu escolher. Pela excelente convivência, força, conselhos e amizade.

Aos amigos que, mesmo de longe, estiveram presentes no meu dia-a-dia. Em especial a Lilian Bastos e Marlucia Lima, pela amizade e carinho.

Aos funcionários Carlos Raimundo, Geraldo, Mêrces, Oswaldo, Reginaldo, Zé Maria, pelo apoio.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o êxito deste trabalho, meu eterno agradecimento.

BIOGRAFIA

CARLA QUINHONES GODOY SOARES, filha de José Tadeu Godoy Soares e Maria de Fátima Souza Quinhones Godoy Soares, nasceu em Lorena, SP, em 07 de novembro de 1981. Concluiu o ensino básico em 1999, no Colégio São Joaquim, em Lorena, SP. Em março de 2001, iniciou o curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em Juiz de Fora, MG, graduando-se em licenciatura em março de 2005, e em bacharelado, em abril de 2006. Ingressou, em maio de 2006, no Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), obtendo o título de mestre em 13 de junho de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CÁPITULO I	
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1. Material vegetal e delineamento experimental.....	17
2.2 Coleta e acondicionamento do material vegetal.....	17
2.3 Extração de proteínas totais de raízes de <i>Coffea canephora</i>	17
2.4 SDS-PAGE e eletroforese bidimensional.....	18
2.5 Visualização das proteínas e análise de imagem após digitalização dos géis bidimensionais.....	19
2.6 Digestão trípica.....	19
2.7 Análise por espectrometria de massa.....	20
2.8 Análise dos espectros e identificação das proteínas.....	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1 Análise do proteoma diferencial em raízes de clones de <i>Coffea canephora</i> sob déficit hídrico (-3,0 MPa).....	22
3.2. Identificação do proteoma diferencial em raízes dos clones sensível (109A) e tolerante (120) sob condições de déficit hídrico.....	27
3.2.1 Metabolismo de carboidratos.....	27
3.2.2 Desenvolvimento e crescimento.....	33
3.2.3 Proteínas envolvidas no processamento protéico.....	38
3.2.4 Proteínas relacionadas com defesa e estresse oxidativo.....	44
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

CÁPITULO II

RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74
1 INTRODUÇÃO.....	75
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1 Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental.....	77
2.2 Potencial hídrico foliar.....	78
2.3 Trocas gasosas.....	78
2.4 Variáveis de fluorescência.....	78
2.5 Peroxidação lipídica.....	79
2.6 Análises estatísticas.....	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1 Status hídrico.....	80
3.2 Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência.....	82
4 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	95
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

RESUMO

SOARES, Carla Quinhones Godoy, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2008. **Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico.** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Fábio Murilo DaMatta.

Compreender os mecanismos como plantas respondem ao estresse hídrico é crucial para prever os impactos das alterações climáticas sobre a produtividade das culturas e dos ecossistemas. As plantas possuem mecanismos de sinalização raiz-parte aérea que geram a orquestração de respostas adaptativas. A sinalização pela raiz, assim como pela parte aérea, é frequentemente considerada importante em regular o crescimento em resposta a condições adversas do meio ambiente. O presente trabalho teve por objetivo integrar os resultados obtidos em café robusta até o presente momento através de estudos de proteínas diferencialmente expressas no sistema radicular em clones com tolerância diferencial (120 tolerante, 109A sensível) sob condições de déficit hídrico e ainda avaliar as respostas fisiológicas diferenciais em resposta as condições de déficit hídrico sob imposição rápida de estresse. As plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) e sob déficit hídrico imposto pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingiram um potencial hídrico na antemãhã (Ψ_{am}) de $-1,5 \pm 0,20$ MPa (moderado), e $-3,0 \pm 0,20$ MPa (severo). As proteínas diferencialmente expressas de raízes foram analisadas através de géis bidimensionais associados a sequenciamento por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF). Em condições de déficit hídrico, o clone 109A apresentou uma redução na abundância relativa em 39 *spots*, e um aumento em 18 *spots*. O clone 120 apresentou uma redução na abundância relativa em 38 *spots* e um aumento em 19 *spots*. A análise do proteoma diferencial em raízes destes dois clones revelou mecanismos de tolerância e aclimação ao déficit hídrico relacionados a metabolismo de carboidratos, metabolismo hormonal, metabolismo energético, morte celular programada, resposta a estresses abióticos e bióticos, detoxificação celular, estresse oxidativo, reparo de DNA e processamento protéico. As análises de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila a mostraram que estes clones exibem mecanismos diferenciais em resposta às condições de déficit hídrico, como já relatado. O clone sensível (109A) apresentou mecanismos relacionados ao dreno do excesso de energia e aumento da dissipação térmica sob déficits hídricos moderados. Porém, em condições de déficit hídrico severo estes mecanismos não se apresentaram mais eficientes neste clone. Por outro lado, o clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico severo apresentou uma redução do rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}) associado à redução nas taxas de transporte de elétrons (ETR) e no coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ), seguido de um aumento da fração de energia absorvida não utilizada na fotoquímica nem dissipada termicamente (P_E). Entretanto este aparente excesso de energia não foi traduzido em danos oxidativos, sugerindo outros tipos de mecanismos envolvidos no dreno do excesso de energia, como modulação de proteínas dos fotossistemas.

ABSTRACT

SOARES, Carla Quinhones Godoy, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2008.
Differential proteomics and physiological characterization of two clones of *Coffea canephora* under water deficit. Adviser: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-advisers: Marcelo Ehlers Loureiro e Fábio Murilo DaMatta.

Understanding the mechanisms by which plants respond to water stress is crucial to predict the climate change impacts on crop productivity and ecosystems. Plants have long-distance root-to-shoot signaling mechanisms that generate the orchestration of adaptive responses. Root system signaling, as well as shoot, is often considered important in growth control in response to environmental adverse conditions. This study aimed to integrate the results obtained in robusta coffee through studies of proteins differentially expressed in the root system in clones with differential tolerance (120 tolerant, 109A susceptible) upon water deficit conditions and also evaluate the differential physiological responses upon fast imposed water deficit conditions. The plants were evaluated upon full irrigation (control) and under water deficit imposed by the suspension of irrigation, until the plants reached water potential (Ψ_{am}) of -1.5 ± 0.20 MPa (moderate) and -3.0 ± 0.20 MPa (severe). The root differentially expressed proteins were analyzed by two-dimensional gels associated to sequencing by mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF). Upon drought, 109A clone showed a reduction in relative abundance in 39 spots, and an increase in 18 spots. 120 clone showed a reduction in relative abundance in 38 spots and an increase in 19 spots. The analysis of root differential proteome in these two clones revealed mechanisms of tolerance and acclimation to water deficit related to carbohydrate metabolism, hormone metabolism, energy metabolism, programmed cell death, abiotic and biotic stresses response, cellular detoxification, oxidative stress, DNA repair and protein processing. The analysis of gas exchange and chlorophyll fluorescence showed that these clones exhibited differential mechanisms in response to water deficit conditions, as already reported. The sensitive clone (109A) showed mechanisms related to drain the excess energy and increase the heat dissipation under moderate water deficit. However, under conditions of severe drought these mechanisms were no more efficient in this clone. On the other hand, tolerant clone (120) under conditions of severe drought showed reduction in effective quantum yield (Φ_{PSII}) associated with a reduction in electron transport rate (ETR) and non-photochemical extinction coefficient (NPQ), followed by an increase in the fraction of absorbed light that was neither used in photochemistry nor dissipated thermally (P_E). However this apparent excess of energy was not translated in oxidative damage, suggesting other types of mechanisms involved in the drainage of energy excess, as the modulation of photosystem proteins.

INTRODUÇÃO GERAL

Café : importância econômica e origem

O café (*Coffea sp.*) é um dos principais produtos agrícolas no mundo. Em 2005, foi o sétimo produto agrícola de exportação mais importantes em termos de valor, atrás de culturas como trigo, milho, soja, arroz (Faostat, 2005). Sendo produzido por mais de 80 países, gerando cerca de 90 bilhões de dólares por ano e envolvendo cerca de 500 milhões de pessoas na sua produção, desde o seu cultivo até a produção final de seu produto para consumo (Rezende & Rosado, 2004). A produção mundial de café no Brasil se destaca por ser uma das maiores no mundo, e tem aumentado muito desde 2003, segundo relatório da Organização Internacional de Café (2008).

Pertence ao grupo das plantas Fanerógamas, angiospermas pertencentes a família das Rubiáceas. Podem ser agrupadas em quatro grupos: Eucoffea, Mascarocoffea, Argocoffea, e Paracoffea, sendo os três primeiros com origem na África e o último na Índia, Indochina, Sri Lanka e na Malásia. Eucoffea compreende as espécies que possuem cafeína, e Mascarocoffes inclui espécies oriundas de Madagascar que apresentam baixo teor de cafeína. Todas as espécies conhecidas de café são diplóides, e com polinização cruzada com incompatibilidade de auto-fecundação, com exceção de *Coffea arábica* que é alotetraploide e possui autofecundação (Charrier & Berthauns, 1985)

O gênero *Coffea* L. encontra-se distribuído em 103 espécies de acordo com Davis *et al.* (2006), onde *Coffea arabica* (café arábica), *Coffea canephora* (café robusta), e *Coffea liberica* (café libéria) são as espécies comercialmente utilizadas, e cerca de 70% são tratadas com distinção como resultado de uma combinação de declínio de quantidade e qualidade de seus habitats. *C. arabica* e *C. canephora* economicamente dominam o comércio mundial de café, sendo responsáveis por 62% e 38%, respectivamente, da produção mundial de café (Dias *et al.*, 2007). É na África central e ocidental, sudeste Asiático (Indonésia e Vietnã) e na América latina, especialmente no Brasil, que se produz a maior parte do café Robusta. A produção de robusta tem aumentado, embora represente apenas cerca de 30% da produção mundial de café. As espécies do gênero *Coffea* são originárias de regiões africanas onde a elevada precipitação anual (1500-2000 mm) exibe uma forte distribuição sazonal, com vários meses consecutivos praticamente sem chuvas. Isso deve ter contribuído,

evolutivamente, para o desenvolvimento de considerável tolerância à seca observada em geral em todas as espécies de café em relação a outras espécies (Kumar & Tiezen, 1980). A qualidade da bebida feita a partir de *Coffea canephora* apresenta-se de qualidade inferior com relação a de *Coffea arábica*. Entretanto *Coffea canephora* apresenta-se mais resistente às condições adversas climáticas como um todo, particularmente a estresses abióticos.

Em diversos países produtores de café, entre eles ao de maior produção mundial como Brasil, Colômbia e Vietnã, a produção de café é fortemente afetada por eventos de seca, podendo diminuir até 80% em anos secos em algumas regiões marginais àquelas ótimas para sua maior produtividade (DaMatta & Ramalho, 2006). Longos períodos de estiagem nas principais regiões produtoras de café no Brasil vêm sofrendo com perdas significativas, representando cerca de uma queda de aproximadamente 30% em relação à perspectiva inicial de colheita (Ximenes, 2007). Muitas das vezes a solução mais comum para a escassez de água é o uso da irrigação, que, além de apresentar custos elevados, não permite sua implantação em todas as regiões, devido, principalmente, à topografia desfavorável. Sendo assim, é necessário que a utilização da irrigação se dê de forma adequada, sem causar danos ambientais e apresentando viabilidade econômica. Dessa forma, a compreensão das relações hídricas das culturas passa a ser de suma importância, na medida em que pode fornecer subsídios úteis ao melhoramento visando a tolerância à seca (DaMatta e Rena, 2001), e desta forma possibilitando o desenvolvimento de programas de melhoramento para introgressão de características agrônômicas importantes em *Coffea arábica* (Guerreiro *et al.*, 1991).

Estresse Abiótico: Déficit Hídrico

As condições de seca induzem respostas fisiológicas e bioquímicas nas plantas, incluindo fechamento estomático, repressão de crescimento celular, redução da taxa fotossintética, aumento da taxa respiratória, ajustamento osmótico, diminuição na eficiência do uso de água, modulação da partição de assimilados e defesas contra danos oxidativos (Ludlow & Muchow, 1990), respondendo às condições de déficit hídrico em níveis celulares e moleculares (Shinozaki & Yamagusho-Shinozaki, 2007).

Na medida em que a água torna-se limitante, com o fechamento estomático, ocorre uma limitação no dióxido de carbono disponível para fixação da fotossíntese e como resultado um decréscimo na eficiência quântica e um excesso de energia nos

centros de reação dos fotossistemas, envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio (superóxido, O_2^- ; oxigênio singlete, *O ; peróxido de hidrogênio, H_2O_2 ; radicais hidroxil, OH^- ; entre outros) que causam peroxidação de lipídeos, danos celulares, inativação de enzimas do ciclo de Calvin, entre outros danos (Tambussi *et al.*, 2000). Sendo assim, sob condições de déficit hídrico, o aparecimento de danos oxidativos é potencializado, e parte desse excesso pode ser utilizada na produção de espécies reativas de oxigênio, potencialmente capazes de resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Smirnoff, 1995; Asada, 1999). O aumento de enzimas do sistema antioxidante mais pronunciado no clone 109A nos trabalhos realizados por Pinheiro *et al.* (2005), Guimarães (2007) e Silva (2007) indicam um maior número de espécies reativas de oxigênio no clone susceptível à seca, indicando que o sistema de defesa a danos oxidativos na clone 120 parece ser mais eficaz na diminuição de espécies reativas de oxigênio, diminuindo danos fotooxidativos (Guimarães, 2007).

Pesquisas envolvendo a sinalização entre raiz/parte-aérea têm aumentado nos últimos anos (Dodd, 2005), e desta forma gerando um melhor entendimento de como a planta responde aos diferentes tipos de estresses, e a existência de uma comunicação entre ambos facilitando a percepção de sinais a longas distâncias. As respostas das plantas às condições de déficit hídrico envolvem uma série de mudanças adaptativas, efeitos deletérios, tolerância, e sob condições de campo essas respostas podem ser antagonisticamente ou sinergicamente modificadas pela interação com outros estresses (Chaves, 2002). A tolerância ao estresse hídrico pode estar ligada a aumento na eficiência na absorção de água do solo, especialmente através do desenvolvimento de um extenso e profundo sistema radicular e de características da parte aérea, como adequação da área foliar, rápido fechamento dos estômatos e manutenção de uma reduzida temperatura foliar, dentre outros (Gomes, 1994; Li *et al.*, 2000).

A partir de estudos realizados por Ferrão *et al.* (2000), onde foram avaliados o desempenho de 500 clones de *Coffea canephora* do grupo conilon em campo, DaMatta *et al.* (2000) selecionaram alguns clones com respostas contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico, dentre eles o clone 120 (tolerante) e 109A (sensível) com objetivo de identificar e compreender mecanismos fisiológicos de tolerância à seca nesta espécie. E desta forma, esses clones já tem sido bem caracterizados quanto às respostas fisiológicas, sabendo que a maior tolerância à seca pode estar associada ao estresse oxidativo, a habilidade para manutenção da exportação de assimilados e à capacidade de manutenção do status hídrico adequado, obtida mediante a combinação de sistema

radicular mais profundo e controle estomático eficiente da transpiração (DaMatta & Ramalho, 2006). Um sistema radicular mais profundo nos clones tolerantes possibilita um melhor acesso à água, mantendo desta forma melhor status hídrico em relação aos clones sensíveis (Pinheiro *et al.*, 2005). A razão entre massa da raiz e área foliar é maior no clone 109A, mas por outro lado a profundidade do sistema radicular é maior no clone tolerante à seca (120), e o potencial hídrico de – 3 MPa é alcançado muito mais rapidamente pelo clone sensível, que também apresenta uma maior queda na condutância estomática, e ainda razão isotópica de carbono é menor do que a encontrada em outros clones, sob condições de estresse. Desta forma, as diferenças na profundidade da raiz, controle estomático, e não ajustamentos osmóticos e elásticos mostram as diferenças na tolerância diferencial ao estresse hídrico no clones tolerante comparados com o sensível (Pinheiro *et al.*, 2005).

Através de estudos de mapas de proteínas diferencialmente expressas em folhas de *Coffea canephora* em géis bidimensionais, sob condições de déficit hídrico, realizados por Guimarães (2007) verificou-se aumento na expressão de alguns chaperones moleculares e de algumas proteínas dos fotossistemas, e modulação na expressão de algumas isoformas da subunidade maior da Rubisco (RbcL), sugerindo uma contribuição para o papel antioxidativo da fotorespiração, como mecanismo de drenagem de um excesso de poder redutor associado com a redução da fotossíntese líquida sob condições estresse. Neste mesmo trabalho, houve uma maior acumulação de uma NADPH: quinona oxidoreductase e manutenção da abundância da glutamina sintase cloroplastídica no clone tolerante, destacando um possível papel no mecanismo antioxidativo associado à tolerância à seca neste clone, e a importância da manutenção da assimilação da amônia e fotorespiração.

Sabendo-se que as plantas exibem mecanismos de sinalização raiz-parte aérea a longas distâncias que geram respostas integrativas. Os sinais químicos e não-químicos são os caminhos pelos quais é promovida a comunicação fisiológica e desta forma ocorre a integração entre raízes e folhas para desenvolvimento das respostas adaptativas as diversidades do meio ambiente. Logo, estudos de proteínas diferencialmente expressas no sistema radicular apresentam-se com um caminho importante para o entendimento dos mecanismos chaves na regulação da resposta diferencial à seca neste clones.

O presente trabalho de tese visa integrar os resultados obtidos neste trabalho as informações de café robusta geradas até o presente momento sob condições de déficit

hídrico para *Coffea canephora* por DaMatta acerca das relações fisiológicas, identificação de proteínas diferencialmente expressas em folhas (Guimarães, 2007), e importância do sistema radicular (Silva, 2007), através de estudos de proteínas diferencialmente expressas no sistema radicular nestes clones sob condições de déficit hídrico e ainda avaliar as respostas fisiológicas diferenciais em resposta as condições de déficit hídrico sob imposição rápida de estresse..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asada K** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50:601-639, 1999
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório M L, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C** How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89:907-916, 2002
- Charrier A & Berthaud J** Botanical classification of coffee. In: Clifford MN, Wilson KC (eds), *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*. Croom Helm, London, Sydney, 1985. p 13-47
- DaMatta FM, Silveira JSM, Ducatti C, Loureiro ME** Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: *Resumo expandido, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Embrapa Café, Brasília, 907-910, 2000
- DaMatta FM & Rena AB** Tolerância do café à seca. In: *Zambolin. Tecnologia de produção de café com qualidade*. 1ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p65-100, 2001
- DaMatta FM & Ramalho JDC** Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1):55-81, 2006
- Davis AP, Govaerts R, Bridson DM, Stoffelen P** An annotated taxonomic conspectus of the genus *coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152: 465–512, 2006
- Dias PC, Araujo WL, Moraes GABK, Barros RS, DaMatta FM** Morphological and physiological responses of two coffee progenies to soil water availability. *Journal of Plant Physiology*, 164(12): 1639-1647, 2007
- Dodd IA** Root-to-shoot signalling: Assessing the roles of ‘up’ in the up and down world of long-distance signalling in planta. *Plant and soil*, 274: 251-270, 2005
- FAOSTAT (Food and Agriculture organization of the United Nations) Agriculture Data**. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 31 de outubro de 2005

- Ferrão RG, Fonseca AFA, Ferrão MAG** Avaliação de clones elites de café conilon em condição de estresse hídrico no estado do Espírito Santo. *In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. EMBRAPA-CAFÉ, Poços de Caldas, 402-404, 2000*
- Guerreiro FO, Medina FHP, Carvalho A** Fontes de resistência ao bicho-mineiro: *Perileucoptera coffeella* em *Coffea sp.* *Bragantia*, 50: 45-55, 1991
- Gomes, RT** Efeito do espaçamento no crescimento e nas relações hídricas de *Eucalyptus* spp na região de cerrado de Minas Gerais. Viçosa: UFV, 1994. 85p. (tese de mestrado)
- Guimarães, BLS** Caracterização molecular da resposta adaptativa de clones de *Coffea canephora* em condições de déficit hídrico e otimização de metodologia para identificação de proteínas de folhas e raiz de café (*Coffea sp.*). Viçosa: UFV, 2007. 61p. (tese de mestrado)
- Kumar D & Tieszen LL** Photosynthesis in *Coffea Arabica*: Effects of light and temperature. *Experimental Agriculture*, 16:13-19, 1980
- Li C, Berninger F, Kostela J, Sonninem E** Drought responses of *Eucalyptus microtheca* provenances depend on seasonality of rainfall in their place of origin. *Australian Journal of Plant Physiology*, 3, 27: 231-238., 2000
- Ludlow MM & Muchow RC** A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Advances in Agronomy*, 43: 107-153, 1990
- Organização Mundial de café (OIC).** Disponível em: <http://www.ico.org/prices/po.html>. Acesso em: 20 abril 2008
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Ducatti C** Drought Tolerance is Associated with Rooting Depth and Stomatal Control of Water Use in Clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany*, 96: 101–108, 2005
- Rezende AM & Rosado PL.** A informação no mercado de café. In: Zambolim L, editor. *Produção integrada de café*. 1ed.Viçosa,MG: Universidade Federal de Viçosa; 2004, p.1–46.
- Silva, VA** Caracterização fisiológica da tolerância à seca em *Coffea canephora* : contribuição relativa do sistema radicular e da parte aérea. Viçosa: UFV, 2007. 57p. (Tese de Doutorado)
- Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K** Gene networks involved in drought response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58: 221-227, 2007

- Smirnoff N** Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Environment and plant metabolism – flexibility and acclimation. 1 ed. Scientific Publishers, Oxford, 217-243, 1995
- Tambussi EA, Bartoli CG, Beltrano J, Guamet JJ, Araus JL** Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). Physiology Plantarum, 108: 398-404, 2000
- Ximenes, G.** Seca deve comprometer o abastecimento de café brasileiro no mercado mundial. Disponível em: <http://www.ambienteemfoco.com.br/>. Acesso em: 25 out. 2007

CAPÍTULO I

ANÁLISE DO PROTEOMA DIFERENCIAL EM RAÍZES DE *Coffea canephora* COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

SOARES, Carla Quinhones Godoy, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, junho de 2008. **Análise do proteoma diferencial de raízes de dois clones de *Coffea canephora* com tolerância diferencial ao déficit hídrico.** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Fábio Murilo DaMatta.

As plantas possuem mecanismos de sinalização raiz-parte aérea que geram a orquestração das respostas adaptativas. A sinalização pela raiz é frequentemente considerada importante em regular o crescimento através da regulação da expressão de proteínas em resposta às condições adversas do meio ambiente, e se traduzem através de sinalização sistêmica por toda a planta. Em *Coffea canephora* as características morfofisiológicas em resposta à seca apresentam-se bem caracterizadas. Entretanto pouco se sabe em relação aos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância diferencial exibida por clones desta espécie. Potencial hídrico severo ($\Psi_{am} = -3$ MPa) foi imposto a dois clones de *Coffea canephora* contrastantes quanto a resposta a seca, sensível (109A) e tolerante ao déficit hídrico (120 tolerante e 109A sensível) e as proteínas diferencialmente expressas de raízes foram analisadas através de géis bidimensionais associados a seqüenciamento por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF). Em condições de déficit hídrico, o clone 109A apresentou uma redução na abundância relativa em 39 *spots*, e um aumento em 18 *spots*. O clone 120 apresentou uma redução na abundância relativa em 38 *spots* e um aumento em 19 *spots*. A análise do proteoma diferencial em raízes destes dois clones revelou mecanismos de tolerância e aclimação ao déficit hídrico relacionados a metabolismo de carboidratos, metabolismo hormonal, metabolismo energético, morte celular programada, resposta a estresses abióticos e bióticos, detoxificação celular, estresse oxidativo, reparo de DNA e processamento protéico. O aumento verificado na abundância de enzimas chaves da via glicolítica denota mecanismos de aclimação relacionados ao aumento do *pool* de hexoses na raiz. Alguns intermediários da glicólise e do ciclo de Krebs podem estar sendo deslocados para outras rotas metabólicas e ainda o aumento de piruvato pode estar relacionado com produção de aminoácidos envolvidos no controle da homeostase celular e também como moléculas sinalizadoras. Foi detectado também o aumento na abundância de proteínas como deidrina, aldeído desidrogenase mitocondrial, monodeidroascorbato redutase e aldo/ceto redutases que têm um papel importante na resposta as condições de déficit hídrico na detoxificação e prevenção de peroxidação lipídica frente às espécies reativas de oxigênio geradas nestas condições. A detecção da abundância diferencial de actinas e diminuição na abundância de enzimas envolvidas na biossíntese de precursores de etileno e giberelinas que podem estar relacionadas com a mudança na arquitetura de raiz. Também se observou diminuição na abundância de carboxilesterases diretamente relacionada ao aumento de hormônios conjugados, que exibem um papel importante na sinalização entre o sistema radicular e a parte aérea. A redução generalizada na abundância de proteínas com função de chaperones moleculares, em virtude da diminuição na ativação da via sinalização de proteínas mal-dobradas em resposta a redução na síntese protéica sob condições de déficit hídrico pode estar relacionado com eventos de morte celular programada. A análise do proteoma da raiz mostrou a existência de interações entre vias metabólicas, apresentando a complexidade dos mecanismos envolvidos na tolerância e aclimação nesta espécie, lançando novas perspectivas de estudos futuros.

ABSTRACT

SOARES, Carla Quinhones Godoy, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, june 2008.
Root differential proteome analysis of two *Coffea canephora* clones with differential tolerance under hidric stress. Adviser: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-advisers: Marcelo Ehlers Loureiro e Fábio Murilo DaMatta.

Plants have long-distance root-to-shoot signaling mechanisms that generate the orchestration of adaptative responses. Root system signaling is often considerate important in growth control by means of protein expression regulation in response to environmental adverse conditions, that are translated as a whole sistemic plant signaling. In *Coffea canephora* plants, the morphological and physiological drought responses are well characterized. However little is known about the molecular mechanisms involved in differential drought tolerance in clones of this species. Severe water deficit (leaf $\Psi_{pd} = -3$ MPa) was imposed to contrasting *Coffea canephora* drought response clones (120 tolerant and 109A sensible) and root differential expressed proteins protein were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (2D) coupled to sequencing by mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF). Under water stress conditions, clone 109A presented decreased relative abundance in 39 spots and increase in 18 spots. Clone 120 showed reduction in the relative abundance of 38 spots and increase in 19 spots. Differential root proteomics analysis of these clones revealed tolerance and acclimation mechanisms related to carbohydrate, hormonal and energetic metabolisms, programmed cell death, biotic and abiotic stress response, cell detoxification, oxidative stress, DNA repair and protein processing. The increased abundance of key enzymes of glycolytic pathway denote acclimation mechanisms related to root hexoses pool increase. Glycolysis and Krebs' cycle intermediates may be deviated to other metabolic pathways. Moreover pyruvate increase could be related to aminoacid synthesis involved in cell homeostasis and as signaling molecules. It was also observed increase in protein abundance like dehydrin, mitochondrial aldehyde dehydrogenase, monodehydroascorbate reductase and aldo/keto reductase, important in water deficit response by detoxification of reactive oxygen species and lipid peroxidation prevention. The detection of differential abundance in actins and abundance decrease in proteins involved in the biosynthesis of ethylene and gibberellins precursors may be involved in root architecture changes. As well as, the decrease in carboxylesterases directly related to increase in hormone conjugation that exhibit an important role in root-to-shoot signaling. The general abundance reduction of proteins with molecular chaperone function, probably by the diminution of unfolded protein response signaling mechanisms due to decreased protein synthesis in water deficit condition could be also related to programmed cell death events. The root proteome analysis revealed the existence of metabolic pathways interactions and the complexity of the mechanisms involved in the water stress tolerance and acclimation in this species, launching new perspectives to future studies.

1. INTRODUÇÃO

O sistema radicular apresenta sua importância em prover fontes essenciais de água e nutrientes para a parte aérea das plantas, e em muitas circunstâncias reduções no crescimento da parte aérea podem ser explicadas pela inabilidade do sistema radicular em suprir essas fontes necessárias (Dodd, 2005). Pesquisas para entendimento da relação existente entre a raiz e a parte-aérea, na sinalização e na resposta a estresses, têm aumentado nos últimos anos (Goodger *et al.*, 2005; Christmann *et al.*, 2007; Neumann *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2007). As plantas são capazes de detectar a deficiência de água no solo independente de alterações no estado hídrico da parte aérea mediante transferência de sinais químicos da raiz para as folhas (Liu *et al.*, 2002), evidenciando a existência de uma comunicação entre ambos os órgãos, e desta forma, facilitando a percepção de sinais a longas distâncias.

A sinalização raiz-parte aérea é importante na regulação do crescimento da parte aérea e no uso da água quando as condições no solo mudam antes de qualquer alteração do status hídrico ou nutricional ser detectada na folha (Dodd, 2005). As respostas das plantas às condições de déficit hídrico envolvem uma série de mudanças adaptativas a efeitos deletérios associados e respostas de tolerância. Sob condições de campo essas respostas podem ser antagonística ou sinergicamente modificadas pela interação com outros estresses (para revisão ver Chaves *et al.*, 2002; Schachtman & Goodger, 2008). A tolerância ao déficit hídrico pode estar ligada a aumento na eficiência na absorção de água do solo, especialmente através do desenvolvimento de um extenso e profundo sistema radicular e de características da parte aérea, como adequação da área foliar, rápido fechamento dos estômatos e manutenção de uma dissipação de energia térmica foliar, dentre outros (Li *et al.*, 2000).

Plantas adaptadas à seca são frequentemente caracterizadas por um profundo e vigoroso sistema radicular (Annicchiarico *et al.*, 2007), de maneira que a profundidade do sistema radicular e alterações na resistência ao fluxo de água dentro do sistema radicular podem ser importantes atributos sob baixa disponibilidade hídrica (Monneveux & Belhassen, 1996). A combinação de mecanismos que restrinjam a perda d'água associados a sistemas radiculares profundos devem ser decisivos para a sobrevivência e/ou relativa estabilidade da produção de plantas tolerantes à seca, quando cultivadas em ambientes sujeitos a estiagens prolongadas (Padilha & Pugnaire, 2007; Songsri *et al.*, 2008).

Sabendo-se da grande interdependência fisiológica entre o sistema radicular e a parte aérea de uma planta (Kramer & Boyer, 1995), trabalhos realizados por Ramos & Carvalho (1997) associaram a tolerância à seca em café com a distribuição e estrutura do sistema radicular, como também Pinheiro *et al.* (2005) verificaram que clones de *Coffe canephora* tolerantes à seca (120) apresentavam o sistema radicular mais profundo que os clones sensíveis à seca (109A). Existem vários trabalhos relatando que a manipulação das interações entre raiz e parte aérea através do uso de técnicas de enxertia podem otimizar uma série de mecanismos envolvidos no desenvolvimento vegetativo e melhorar o rendimento e qualidade das cultivares (Lockard & Schneider, 1981; Castle, 1995) como alterações nos fatores endógenos de crescimento envolvendo hormônios, proteínas, vitaminas (Sorce *et al.*, 2002), influência direta da cicatrização no transporte através do xilema e floema após a enxertia (Atkinson *et al.*, 2003), e ainda o aumento na tolerância a estresses abióticos (Cuartero *et al.*, 2006). A seleção de porta enxertos tolerantes a seca em videiras e macieiras observadas por Souza *et al.* (2005) e também porta-enxertos de *C. canephora* em enxertos de *C. arabica* observados por Tomaz *et al.* (2006) mostraram a importância do sistema radicular com relação à tolerância à seca.

A sinalização raiz-parte aérea é frequentemente considerada importante em regular o crescimento através da regulação da expressão gênica de proteínas (Takei *et al.*, 2001). Alguns desses estímulos ocorrem na parte aérea em resposta a estímulos gerados na própria folha, ou em outro local da planta (Pereira & Chaves, 1993). O aumento de ABA nas folhas durante o déficit hídrico pode ser resultado da biossíntese nas folhas, redistribuição nas células do mesófilo e translocação de ABA sintetizado das raízes para a parte aérea (Davies & Zhang, 1991; Dodd, 2005). O sistema radicular pode retardar déficits hídricos em função das características morfológicas ou por meio de sinais bioquímicos, como ABA, citocinina e precursores do etileno transportados da raiz para a parte aérea (Wilkinson & Davis, 1997). Hansen *et al.* (1999) demonstraram que a concentração de ABA na seiva xilemática aumenta sobre condições de estresse hídrico, o que pode estar diretamente relacionado a condições de tolerância. Alvarez *et al.* (2008) mostraram em estudos do proteoma e metaboloma da seiva do xilema de milho que existem alterações em hormônios como ABA e citocininas em condições de déficit hídrico.

A influência do sistema radicular em retardar o estabelecimento de déficits hídricos internos pode então ocorrer em função das características morfológicas do

sistema radicular ou por meio de sinais bioquímicos, como hormônios transportados da raiz a parte aérea. Além disso, o aumento na síntese de hormônios vegetais em raízes de plantas submetidas à deficiência hídrica, alterações na composição de nutrientes minerais (Gollan *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1997), ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares-álcoois podem ter o papel de moléculas sinalizadoras (Patonnier *et al.*, 1999).

Através de vários anos de pesquisa a cerca da fisiologia de espécies do gênero *Coffea*, tem se mostrado que genótipos do grupo canéfora exibem maior potencial de ajustamento osmótico e de aumento no módulo de elasticidade (DaMatta *et al.*, 1993), além de apresentarem sistema radicular mais profundo em relação a cultivares do grupo Arábica (Ramos & Lima, 1980), compensando as perdas transpiratórias via aumento de absorção de água. Um sistema radicular mais profundo nos clones tolerantes possibilita um melhor acesso à água, mantendo desta forma melhor status hídrico em relação aos clones sensíveis (Pinheiro *et al.*, 2005). A razão entre massa da raiz e área foliar é maior no clone sensível 109A, mas por outro lado a profundidade do sistema radicular é maior no clone tolerante à seca (120), e o potencial hídrico de -3 MPa é alcançado muito mais rapidamente pelo clone sensível, que também apresenta uma maior queda na condutância estomática e, ainda, a razão isotópica de carbono é menor do que a encontrada em outros clones, sob condições de estresse (Pinheiro *et al.*, 2005; Silva, 2007; Guimarães, 2007). Desta forma as diferenças na profundidade da raiz, controle estomático, e ajustamentos osmóticos e elásticos, explicam largamente as diferenças na tolerância diferencial ao estresse hídrico nos clones tolerantes comparados com os sensíveis (Pinheiro *et al.*, 2005). Em experimentos de enxertia recíproca realizados por Silva (2007) entre dois genótipos de *Coffea canephora*, tolerante (120) e sensível (109A), verificou-se que existe uma contribuição do sistema radicular do clone tolerante (120) em retardar o déficit hídrico na parte aérea de clone sensível (109A), em função de maior acúmulo de ácido abscísico no sistema radicular do clone tolerante (120).

Os genes induzidos em condições de estresse têm sua função não somente na produção de importantes proteínas do metabolismo, com também na regulação de genes na transdução de sinal (Dergisi, 2005), e podem ser separados em proteínas que provavelmente funcionam na resposta ao stress, como aquoporinas, proteínas necessárias para produção de vários osmoprotetores (açúcar, prolina, glicina, betalaina, etc.), proteínas que protegem macromoléculas e membranas, proteínas *late-embriogenesis abundant protein* (LEA), chaperones, proteínas ligadoras de mRNA, proteases, e enzimas de detoxificação. O segundo grupo contém proteínas envolvidas na

regulação de da transdução de sinal, expressão gênica (ativação e inativação), como as proteínas cinases, fatores transcricionais, fosfolipases C, proteínas de biossíntese de ácido abscísico (ABA) (Dergisi, 2005; Umezawa, 2006). Muitas proteínas sofrem modificações pós-traducionais como remoção de peptídeos sinais, fosforilação, glicosilação, carbamilação, e entre outros que são extremamente importantes para atividade e localização sub-celular (Krishna & Wold, 1993; Garavelli *et al.*, 2001).

Os recentes avanços na proteômica têm possibilitado o estudo de processos biológicos dinâmicos com a análise sistemática do perfil protéico expresso sob determinada condição em um organismo, e ainda mapeamento de caminhos metabólicos e a identificação de novos genes alvos que podem ser usados na manipulação genética (Pandey & Mann, 2000; Patterson & Aebersold, 2003).

O presente trabalho de tese visou integrar as informações geradas até o presente momento acerca das relações fisiológicas em *Coffea canephora* sob condições de déficit hídrico e os mecanismos moleculares responsáveis por estas respostas através da análise do proteoma de raízes de clones de *Coffea canephora* com tolerância diferencial ao déficit hídrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e delineamento experimental

Os clones 120 (genótipo tolerante ao déficit hídrico) e 109A (genótipo sensível ao déficit hídrico) de *Coffea canephora* Pierre var. *Kouillou* foram obtidos no Instituto Capixaba de Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação em vasos de 12 L preenchidos com solo, esterco de curral curtido e areia, na proporção de 3:1:1 (v/v/v). Plantas de 10 meses de idade foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) ou submetidas a déficit hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingissem um potencial hídrico na antemanhã (Ψ_{am}) de $-3,0 \pm 0,25$ MPa, valor que caracteriza uma condição de estresse severo para plantas de café (Lima *et al.*, 2002). Foram realizadas medições do potencial hídrico sempre às 05:00h da manhã em folhas completamente expandidas sendo no terceiro ou quarto par do ramo plagiotrópico, por meio de uma bomba de pressão do tipo Scholander conforme descrito por DaMatta *et al.* (1997).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente ao acaso, formando um esquema em fatorial 2 x 2 (2 clones, 2 regimes, 5 repetições). A parcela foi constituída de uma planta por vaso dentro de cada bloco que constituiu o experimento. Foi feito a análise de variância (ANOVA), sendo posteriormente aplicado um teste de médias, Newman-Keuls a 5% de probabilidade utilizando o software Statistica 7.

2.2 Coleta e acondicionamento do material vegetal

Raízes de cafeeiros de plantas submetidas ou não ao déficit hídrico foram coletadas quando apresentaram Ψ_w na antemanhã de aproximadamente -3 MPa (déficit hídrico), acondicionadas em envelopes de papel aluminizado, congeladas sob nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C , para serem usadas para o preparo dos extratos protéicos.

2.3 Extração de proteínas totais de raízes de *Coffea canephora*

Para extração de proteínas de raiz de café foi utilizado protocolo descrito por Guimarães (2007). Raízes de café foram pulverizadas em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido. O tecido pulverizado (aproximadamente 1,5 g) foi ressuspenso em TCA 10% (m/v) e 2-mercaptoetanol 0,07% (v/v) (1 mL para cada 0,1g tecido) e macerado no almofariz, e deixado em repouso por 2h, a -20°C . Após centrifugação a

10000 g por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado cinco vezes em acetona gelada. Após liofilização o precipitado foi novamente pulverizado com areia até a obtenção de um pó fino e transferido para um novo tubo de centrifuga. Cerca de 0,05 a 0,1 g de pó fino foram ressuspensos em 0,8 mL de fenol tamponado (tampão Tris, pH 8.0) e 0,8 mL de tampão SDS-denso (sacarose 30 %, SDS 2 %, Tris-HCl 0,1M, pH 8,0; 2-mercaptoetanol 5% em um microtubo de 2 ml. A mistura foi homogeneizada por 30 segundos e a fase fenólica separada por centrifugação a 10.000 g por 5 min. A fase superior fenólica foi pipetada e transferida para outros tubos. À fase fenólica foram adicionadas a cinco volumes de acetato de amônio 0,1M em metanol para precipitação das proteínas a -20°C, por 12h. As proteínas precipitadas foram sedimentadas por centrifugação a 10.000g por 5 min, e lavadas por duas vezes com acetato de amônio 0,1M em metanol, seguida de duas lavagens com acetona 80%. O precipitado final seco foi dissolvido em tampão de amostra para gel bidimensional (uréia 8M, CHAPS 4%, IPG-buffer 2% (Amersham Biosciences), DTT 80 mM, azul de bromofenol 2%), e sonicado por três vezes por 1 minuto no gelo. A concentração protéica foi determinada nas amostras de acordo com o método de Bradford (1976).

2.4 SDS-PAGE e eletroforese bidimensional

Foram feitas análises de pureza das amostras e presença de degradação em gel SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970). As amostras protéicas foram desnaturadas a 95°C por 5 min e aplicadas em gel SDS-PAGE 12% (40 µg de proteína por poço). Os géis SDS-PAGE foram corados com azul de Coomassie R-250. Para a primeira dimensão ou focalização isoeletrica (IEF) foram usadas fitas de 18 cm e pH 4–7 (*Amersham Biosciences*) reidratadas por 14-20 h em 500 µL de tampão de reidratação (uréia 8M, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0,002%, tampão IPG 2%, DTT 2 mM). As amostras (1 mg de proteína) foram aplicadas no copo de aplicação. A IEF foi realizada em aparelho *Multithor II* (*Amersham Biosciences*) a 20°C, e as condições elétricas foram: 1 min a 500 V, 30 min a 1500 V e 9 h a 3000 V. Para a análise da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas por 15 min em 10 mL de solução de equilíbrio (uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%, tris 50 mM, pH 8.8) contendo 100 mM de DTT. A separação da segunda dimensão foi realizada em aparelho *PROTEAN II Ready Gel System* (*BioRad*) com espaçadores de 1,5 mm em gel de poliacrilamida 12%. As condições elétricas da eletroforese foram 15 min 15 mA/gel, 7 h 30 mA/gel.

2.5 Visualização das proteínas e análise de imagem após digitalização dos géis bidimensionais

Os géis foram corados pela técnica de Coomassie coloidal. Primeiramente os géis foram fixados em solução contendo ácido fosfórico 2% (v/v) e etanol 30% por 30 min, em seguida enxaguado três vezes em ácido fosfórico 2% (v/v) por 20 min, e incubado em solução contendo etanol 18%, sulfato de amônio 15% (v/v) e ácido fosfórico 2% (v/v) por 30 min. Em seguida, os géis foram corados pela adição de azul de coomassie G-250 coloidal 0,02% por 72 h. Por último, mantidos em solução de ácido acético 1% até a digitalização. Os géis foram escaneados e calibrados pelo programa *Labscan* (Amersham Biosciences). As análises das imagens digitalizadas de cada gel foram realizadas no programa *ImageMaster 2D platinum* (Amersham Biosciences). As massas moleculares das proteínas foram determinadas utilizando padrões de massa molecular (*Broad Range - Molecular Weight Marker*, BioRad) presentes em cada gel. Nas análises foram consideradas proteínas diferencialmente expressas aquelas que apresentaram uma variação na porcentagem de volume entre os tratamentos de 1,5 vezes ou mais (média de três géis), contendo proteínas oriundas de extrações e réplicas biológicas independentes. Foram retiradas somente aquelas proteínas onde a expressão diferencial era reduzida ou aumentada em mais de 1,5 vezes, e onde essa diferença era estatisticamente significativa segundo teste T ($p \leq 0.05$), e desta forma avaliada a expressão diferencial significativa sob efeito de tratamento sob condições de déficit hídrico.

2.6 Digestão trípica

Os *spots* excisados dos géis foram transferidos para microtubos de 0,6 mL e digeridos com tripsina. A digestão foi realizada segundo protocolo de digestão trípica estabelecido por Shevchenko (2006), onde os pedaços de géis excisados foram descorados em 3 lavagens com solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0. Após a segunda lavagem, foi deixado *overnight* sob agitação constante, e depois procedeu-se a terceira lavagem. A acetonitrila foi removida e o gel foi desidratado com 200 μ L de acetonitrila (100%), depois esta foi removida e os géis secados no vácuo por 15 minutos. Os pedaços de gel foram reduzidos em 100 μ L de DTT 65 mM por 30 minutos, à temperatura de 56 °C. Posteriormente foram alquilados com 100 μ L de iodoacetamida 200 mM, por 30 min à temperatura ambiente, lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10min e desidratados com 200 μ L

de acetonitrila por 5 minutos. A acetonitrila foi removida e feita nova reidratação com 200 μL de bicarbonato de amônio 100 mM, seguido de duas etapas de desidratação com 200 μL de acetonitrila 100%. Após remoção da solução de acetonitrila, os géis foram secos a vácuo por 15 minutos. Foram adicionados 20 μL de uma solução de tripsina 25 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ por 45 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionado uma solução de 50 μL de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10%, *overnight* por 37 °C. As amostras constituídas de peptídeos obtidos por digestão triptica foram purificadas e desalinizadas utilizando ponteiros de 0,6 μL ZipTip[®] com resina C₁₈ (Millipore) segundo o protocolo do fabricante. Primeiramente, as ponteiros ZipTip[®] C₁₈ foram lavadas com uma solução de acetonitrila 100% , usando o volume máximo de 10 μL da ponteira, certificando-se de que foram feitas 10 lavagens, dispensando sempre a solução após cada lavagem. Após a etapa de carregamento, as ponteiros foram lavadas com solução de ácido trifluoacético 0,1%, aspirando e dispensando a solução cerca de 10 vezes. Em um microtubo contendo 1,5 μL de uma solução de acetonitrila 50% em ácido trifluoroacético 0,1% os peptídeos foram eluidos aspirando e dispensando a amostra 10 vezes dentro do mesmo microtubo.

2.7 Análise por espectrometria de massa

As amostras foram aplicadas na proporção 1:1 de amostra e ácido α -ciano-4-hidrocinâmico em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Os fragmentos resultantes da digestão triptica foram analisados no intervalo de 800–3500 Da no instrumento MALDI-TOF-TOF (Modelo 4700 Proteomics Analyser, Applied Biosystems) Versão 3.0 software, tanto no modo MS quanto MS/MS, com intervalo de confiança monoisotópica de 0,2 Da/0,6 Da. Os peptídeos foram identificados usando o algoritmo de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), e algoritmo *MS/MS Ion Score*, ambos contidos no programa Mascot 4[®], sendo que peptídeos com espectros com *ion score* menor que 40 foram considerados com identificação não validada ou abaixo do nível de confiabilidade, sendo feito também uma posterior análise de todos os espectros validados, reavaliando-os, confirmando as identificações. Para tal visualização dos espectros e organização de todos dados gerados foi utilizando o software *SCAFFOLD*[®]-*Confident protein identification*, ©2006 Proteome Software Inc.

2.8 Análise dos espectros e identificação das proteínas

Os espectros MS/MS gerados foram confrontados contra o banco de dados de seqüências de contigs traduzidos nos seis *frames* do banco de *expressed sequence tags* (EST) de Café Unigene CafEST (Projeto de Genômica de Café Brasileiro- EMBRAPA CENARGEN- <https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>), onde a anotação funcional dos ESTs e a caracterização dos contigs já são comparadas com seqüências protéicas presentes no banco de dados NCBI-Nr (*National Center for Biotechnology Information-Non redundant*). Desta forma foram gerados dados onde se obteve o número de acesso do *contig* no banco de dados. A massa molecular experimental foi obtida através de padrões de massa molecular (*Broad Range- Molecular Weight Marker, BioRad*). O ponto isoelétrico experimental foi obtido no programa *Image Master 2D Platinum*. O ponto isoelétrico e a massa molecular teóricos das seqüências traduzidas dos *contigs* (*frame* homologa à seqüência peptídica de cada *spot* que foi identificada por espectrometria de massas) foram calculados através do programa *Protein prospector* disponível *on line* no site <http://prospector.ucsf.edu/cgi-bin/>, na ferramenta *MS-Digest*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do proteoma diferencial em raízes de clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico (-3,0 MPa)

As análises do proteoma diferencial foram feitas em raízes retiradas de dois clones de *Coffea canephora*, sensível ao déficit hídrico (109A) e tolerante ao déficit hídrico (120), que faziam parte de um experimento de caracterização fisiológica realizado por Silva (2007) e Guimarães (2007). O potencial hídrico não diferiu entre os clones sob condições irrigadas (controle) durante todo o experimento, sendo sempre superior a -0,05 MPa. Em contraste, o potencial hídrico de antemanhã declinou significativamente nos clones sob condições não-irrigadas (tratado), sendo que este declínio foi mais acelerado no clone 109A que atingiu - 3,0 MPa por volta do décimo segundo dia após a suspensão da irrigação. Por outro lado, no clone 120 este mesmo nível de estresse só foi observado no décimo quarto dia após a suspensão da irrigação.

As amostras de proteínas totais extraídas foram separadas na primeira dimensão por ponto isoeletrico em gradiente de pH linear (pH 4-7), e posteriormente por peso molecular na segunda dimensão por eletroforese em condições desnaturantes (Figuras 2 e 3). As análises das imagens dos géis bidimensionais no programa *Image Master 2D Platinum* foram realizadas sempre comparando os diferentes tratamentos dentro de um mesmo clone. Estas análises mostraram reprodutibilidade dos resultados, havendo grande semelhança entre géis de um mesmo clone através da análise de correspondência dos *spots* entre géis de plantas irrigadas e não-irrigadas. Na figura 1 o gráfico mostra a correspondência de *spots* entre géis de proteínas de raízes de plantas irrigadas e não-irrigadas dentro de cada clone. No clone sensível foi detectado um total de 595 *spots*, onde 302 apresentaram correspondência (Figura 1A). Dentre os 602 *spots* totais detectados para o clone tolerante (120), 323 apresentaram correspondência entre géis de proteínas extraídas de raízes de plantas irrigadas e não-irrigadas (Figura 1B). Neste tipo de gráfico, diferenças de porcentagem em volume (abundância relativa) entre géis de amostras obtidas de plantas irrigadas e não-irrigadas denotam maiores efeitos de tratamento quando apresentarem valores de correlação mais distantes de 1 unidade.

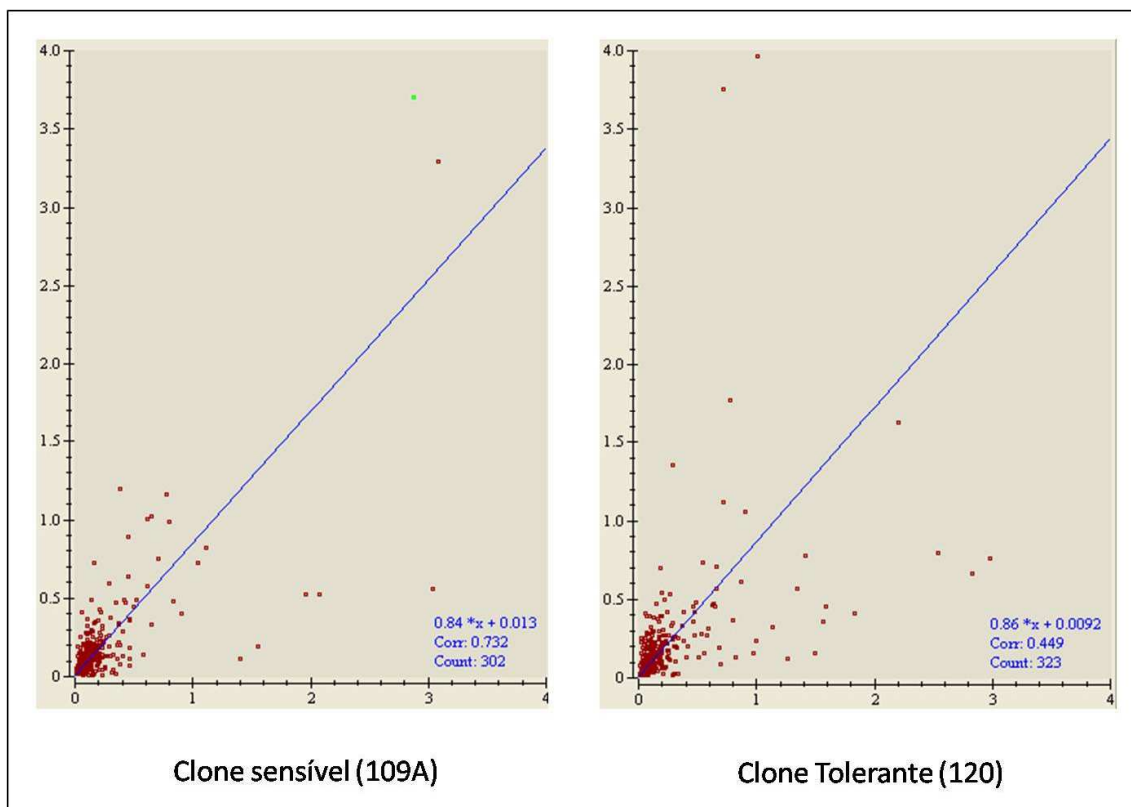


Figura 1. Correlação entre *spots* de géis de proteínas de raízes de plantas irrigadas e não-irrigadas dentro de cada clone. (A) Clone sensível (109A), correlação entre a porcentagem em volume de géis bidimensionais irrigados e não-irrigados. (B) Clone tolerante (120), correlação entre a porcentagem em volume de géis bidimensionais irrigados e não-irrigados. Análise foi realizada no *software Image Master 2D platinum*. Legenda: *Count* refere-se ao número de *spots* onde existe correspondência. *Corr* refere-se a correlação entre porcentagem em volume para um mesmo *spot* em géis de tratamentos diferentes. O gráfico do tipo *Scatter Plot* é caracterizado por uma equação da reta linear $y = ax + b$, onde valores de “a” próximos de um e valores de “b” próximos a zero mostram menores diferenças entre géis controles e tratados. Maiores efeito de tratamento (diferenças de porcentagem em volume entre géis controles e tratados) denotam valores de correlação (*Corr*) mais distantes de uma unidade. Cada ponto no gráfico significa um *spot* onde foi encontrada correspondência entre gel controle e gel tratado. Clone sensível (109A) apresenta 302 *spots* correspondentes e o clone tolerante (120) apresenta 323 *spots* correspondentes.

A comparação dos géis de amostras do clone sensível (109A) apresentou uma correlação de 0,732 e do clone tolerante (120) 0,449. A partir destes valores é possível afirmar que existe uma diferença na abundância relativa de proteínas de raízes entre condições irrigadas e não-irrigadas (déficit hídrico). Além das análises de correspondência foi realizada análise visual individualizada para confirmar a correspondência de cada *spot* em todos os géis. Para os *spots* onde foi verificada correspondência em todos os géis, procedeu-se a análise de expressão diferencial através da diferença entre a abundância relativa de cada *spot* sob condições irrigadas e não-irrigadas dentro de um mesmo clone. A abundância relativa de cada *spot* dentro de um mesmo tratamento foi determinada através da média da abundância relativa de triplicatas biológicas. Os *spots* onde a abundância relativa aumentou ou diminuiu em pelo menos 1,5 vezes sob efeito do déficit hídrico, e a abundância foi significativamente diferente segundo o teste t ($p \leq 0,05$) em pelo menos um dos clones, foram elencados como diferencialmente expressos e retirados para identificação por espectrometria de massa por MALDI-TOF-TOF. Dentre os *spots* retirados para o sequenciamento, todos apresentaram reprodutibilidade entre as triplicatas dentro de cada tratamento, e intensidade suficiente para detecção por espectrometria de massa. Foram identificados 57 *spots* que apresentaram abundância diferencial (Tabela 1).

Na figura 2 estão apresentados os *spots* que apresentaram abundância diferencial em raízes do clone sensível (109A) e que foram retirados para identificação por espectrometria de massa. Os números de identificação de cada um dos *spots* indicados no gel bidimensional da figura 2 permite a verificação da abundância relativa de cada *spot* nas tabelas 1 e 2. O clone sensível (109A) apresentou uma redução na abundância relativa em 38 *spots*, e um aumento da abundância relativa em 18 *spots* sob condições de déficit hídrico (Tabela 1).

Na figura 3 estão apresentados os *spots* que apresentaram abundância diferencial em raízes do clone tolerante (120) que foram retirados para identificação por espectrometria de massa. Os número de identificação de cada um dos *spots* indicados no gel bidimensional da figura 3 permite a verificação da abundância relativa de cada *spot* nas tabelas 1 e 2. O clone tolerante (120) apresentou uma redução na abundância relativa em 38 *spots*, e um aumento da abundância relativa em 19 *spots* sob condições de déficit hídrico (Tabela 1). O *spot* 41 só apresentou abundância relativa detectável no clone tolerante (120) em condições não-irrigadas.

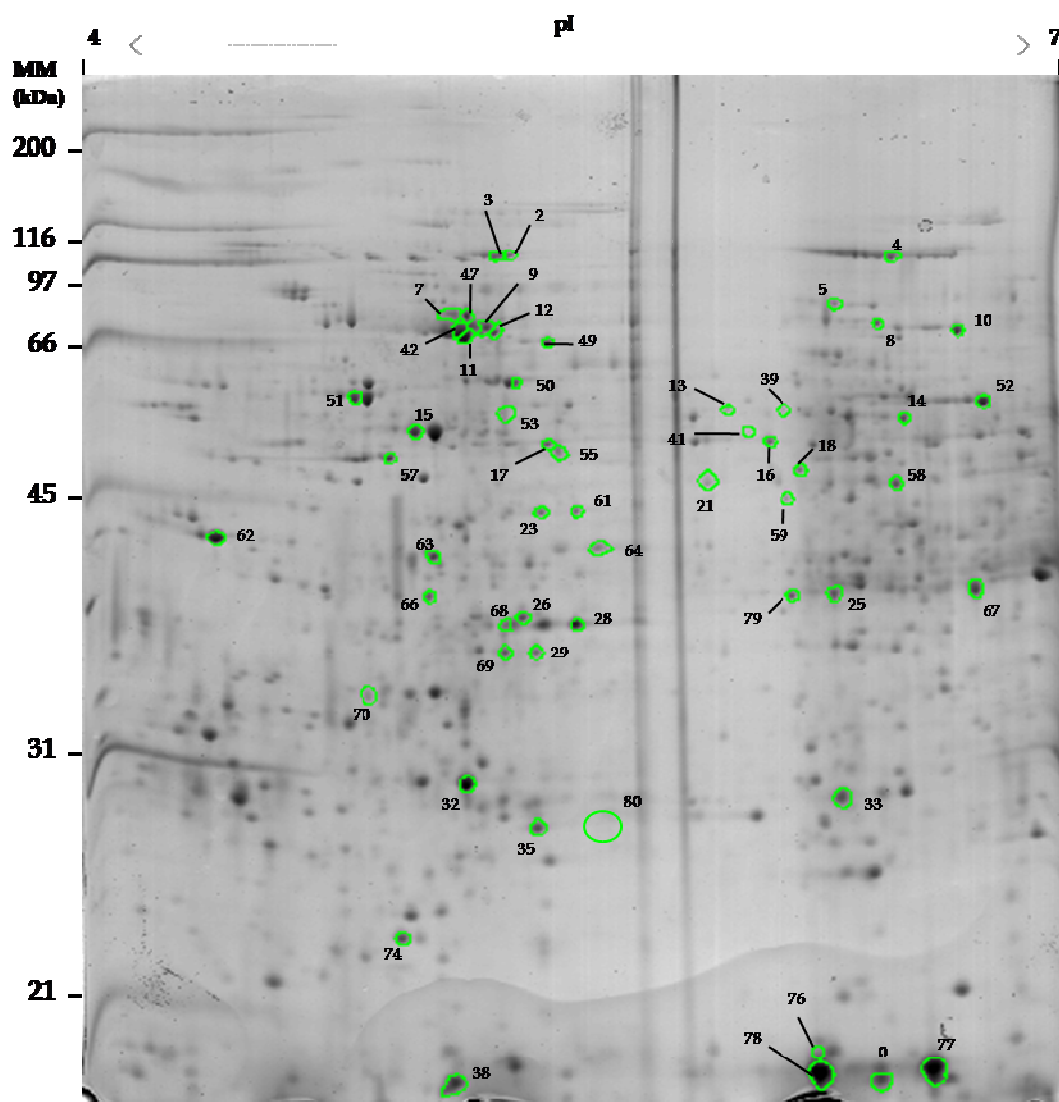


Figura 2. Proteínas de raiz com expressão diferencial no clone sensível (109A) de *Coffea canephora* quando submetido ao déficit hídrico severo ($-3,0$ MPa). Proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por SDS-PAGE, e coradas com azul de *Coomassie*. A expressão diferencial foi analisada no *software Image Master 2D platinum*.

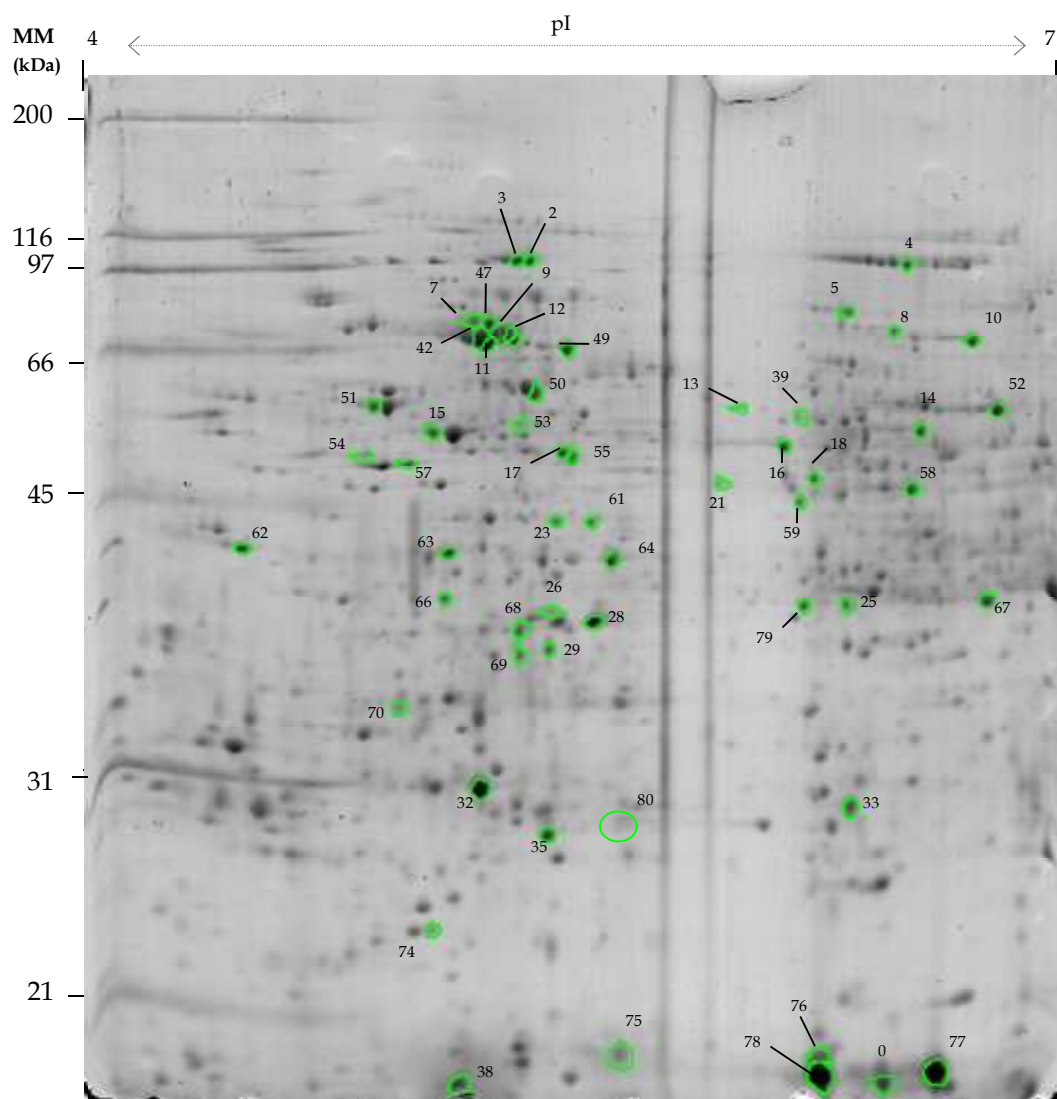


Figura 3. Proteínas de raiz com expressão diferencial no clone tolerante (120) de *Coffea canephora* quando submetido ao déficit hídrico severo (– 3,0 MPa). Proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por SDS-PAGE, e coradas com azul de Coomassie. A expressão diferencial foi analisada no *software Image Master 2D platinum*.

3.2. Identificação do proteoma diferencial em raízes dos clones sensível (109A) e tolerante (120) sob condições de déficit hídrico

A tabela 1 contém os dados referentes à abundância relativa de cada *spot* nos dois clones sob condições irrigadas e não-irrigadas. A tabela 2 mostra a identificação putativa dos *spots* indicados nas figuras 2 e 3, e as seqüências de aminoácidos dos peptídeos correspondentes obtidas por espectrometria de massa. Nesta tabela também está indicado o número do *contig* homólogo do banco de ESTs de café e respectivo *frame* de tradução. O número de acesso indicado corresponde à seqüência de proteína do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com maior identidade com os peptídeos seqüenciados. As proteínas identificadas foram agrupadas em categorias e subcategorias funcionais: metabolismo de carboidratos, desenvolvimento e crescimento, proteínas envolvidas no processamento protéico e proteínas relacionadas com defesa e estresse oxidativo.

3.2.1 Metabolismo de carboidratos

A fosforilação de hexoses é uma das primeiras etapas da glicólise (Krueger, 1997), sendo que hexoses como as frutocinases participam na catalisação de reações irreversíveis de fosforilação especificamente em açúcares do tipo frutose (Pego & Smeekens, 2000) (Figura 4). A respiração no sistema radicular é fonte de energia para o crescimento e manutenção de inúmeros processos celulares, especialmente sob condições de estresses. A relação fonte: dreno é fortemente afetada por eventos de déficit hídrico, e causa redução do crescimento da parte aérea em relação ao sistema radicular. Este fato pode ser observado no aumento da relação raiz/parte aérea que pode resultar em aumento no transporte dos assimilados para o sistema radicular. Schellebaum *et al* (1998) mostraram um significativo aumento da concentração de hexoses nas raízes de plantas submetidas a condições de déficit hídrico, e que o *pool* de hexoses gerado na parte aérea também seria deslocado para as raízes com o propósito de ajustamento osmótico no sistema radicular. Praxedes *et al.* (2006) em experimentos com folhas de *Coffea canephora* mostraram que o clone tolerante (120) exibe um aumento da concentração de hexoses na parte aérea. O aumento de 56 % de uma enzima frutocinase (*spot* 68, Figura 3; Tabela 1) no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico sugere o aumento *pool* de hexoses no sistema radicular considerando

inibição de outras enzimas da respiração, fato relatado por Schellebaum *et al* (1998). E ainda, o aumento do *pool* de hexoses no clone tolerante (120) também pode estar relacionado com a via das pentoses fosfatadas que exibe papel importante na produção de poder redutor nas vias anabólicas, o NADPH, assim como outro composto importante, a ribose-5-fosfato, gerando pentoses indispensáveis para a biossíntese de ácidos nucleicos e açúcares estruturais sugerindo uma relação destes resultados com a maior tolerância à seca exibida por este clone. No clone sensível (109A) foi observada uma diminuição na abundância desta proteína sob condições de déficit hídrico (Figura 2; Tabela 1).

A triose fosfato isomerase é uma enzima envolvida na via glicolítica, responsável por catalisar a isomerização reversível do gliceraldeído-3-fosfato em dihidroacetona fosfato através de duas transferências protônicas envolvendo ácidos carbônicos e transferência adicional de prótons em átomos de oxigênio (Rozovsky & McDermott, 2007). Ocorreu uma redução de 36 % na abundância da proteína triose fosfato isomerase (*spot* 33) no clone sensível (109A) e de 42 % no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). A redução da abundância em ambos os clones sugere que estaria ocorrendo uma diminuição na interconversão desses compostos, gliceraldeído-3-fosfato e dihidroacetona (Figura 4). A diminuição da interconversão de dihidroacetona em gliceraldeído-3-fosfato pode estar relacionada com o deslocamento deste intermediário da via glicolítica para outras vias, como por exemplo, para a formação de glicerol-3-fosfato participando do metabolismo de lipídeos (Figura 4).

A enolase, 2-fosfo-D-glicerato hidrolase, é uma enzima que catalisa a conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, a única etapa de desidratação da via glicolítica (Van Der Straeten *et al.* 1991). Uma enolase (*spot* 16) teve a abundância aumentada em 19 % no clone sensível (109A) e reduzida em 60 % no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Para outra enolase (*spot* 41) a abundância só foi detectada em géis de plantas não-irrigadas de ambos os clones (Tabela 1). O *contig* 17950 apresenta maior identidade com uma enolase codificada pelo gene *ENO1*(NCBI 17/05/2008). Na tabela 2 podemos verificar que estas duas enolases (*spot* 16 e 41) são codificadas por um mesmo gene, uma vez que apresentaram homologia com dois *contigs* idênticos (Tabela 2). Entretanto apresentaram pontos isoeletrônicos diferentes no gel bidimensional, o que sugere eventos de modificação pós-traducional (Figuras 2 e 3). Gomes *et al.* (2006) mostraram uma modificação pós-

traducional em resíduos de arginina e lisina que reagiram com moléculas de carbonil da proteína enolase, exercendo profundos efeitos na sua função, causando perda de atividade glicolítica desta enzima. Lee *et al.* (2002) mostraram que o gene *los2* codifica uma enolase bi-funcional envolvida na expressão gênica de genes responsivos a baixas temperaturas e acredita-se funcionar como fator transcricional que controla *STZ/ZAT10* que exerce controle negativo sobre a expressão de genes responsivos à estresses regulados pelo promotor *RD29A*, aumentando a tolerância à seca em tabaco. Através de um alinhamento da sequência do *contig* 17950 com mapa genômico de *Arabidopsis thaliana* através da ferramenta *blastn* foi verificado uma identidade de 85% com o gene *los2* de *A. thaliana* (*Signal- Atgene Express*, 16/05/2008). Contudo, destacando a possibilidade de modificação pós-traducional nestas proteínas e ainda a identidade encontrada com o gene *los2*, o aumento na abundância desta proteína pode estar relacionada à mecanismos de tolerância à seca nestes clones, e não com eventos relacionados a função em etapas glicolítica, uma vez que modificações pós-traducionais causariam a perda da função glicolítica. Entretanto, a alta identidade encontrada no alinhamento com sequência de proteínas de enolases envolvidas na etapa glicolítica não descarta a hipótese de uma possível atuação desta proteína em vias glicolíticas. Sendo a enolase uma enzima que catalisa a reação no sentido da glicólise, como também no sentido da gliconeogênese (Figura 4), ela também pode estar envolvida na produção de hexoses fosfatadas contribuindo para o ajustamento osmótico no sistema radicular como um mecanismo de aclimação às condições de déficit hídrico.

O complexo da piruvato desidrogenase é composto de múltiplas enzimas que catalisam a descarboxilação oxidativa do piruvato, reações ocorrendo sequencialmente nas enzimas E₁, E₂ e E₃ (Mooney *et al.*, 1999), ligando a via glicolítica à via oxidativa do ciclo do ácido tricarboxílico (Patel & Korotchkina, 2006). Este complexo pode estar envolvido em muitos mecanismos de regulação envolvendo interações entre suas proteínas componentes, detectando mudanças em seus substratos, produtos e estado redox intramitocondrial, mantendo a homeostase celular (Patel & Korotchkina, 2006). Componentes do complexo da piruvato desidrogenase como a proteína dihidrolipoamida desidrogenase ou subunidade E₂ (*spot* 52) apresentou redução na abundância relativa em 57% no clone sensível (109A) e 43 % no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1) e ainda a proteína dihidrolipoamida acetiltransferase ou subunidade E₃ (*spot* 55) apresentou uma redução de 79 % e 61 % na abundância protéica nos clones sensível (109A) e tolerante (120) sob

condições de déficit hídrico, respectivamente. A redução na abundância relativa do complexo da piruvato desidrogenase pode estar relacionada à regulação negativa desta enzima, em vista da necessidade de deslocamento de compostos produzidos anteriormente a sua posição na via glicolítica, para outras vias (Figura 4).

A proteína aconitase é uma enzima encontrada tanto na matriz mitocondrial, como também no citossol, sendo que sua forma citossólica participa do ciclo do glioxalato em células vegetais (Hayashi *et al.*, 1995) e a isoforma mitocondrial é componente do ciclo do ácido cítrico onde cataliza a isomerização reversível do citrato em isocitrato através de um produto intermediário *cis*-aconitato (Moeder *et al.*, 2007). A redução na abundância relativa de uma aconitase (*spot 4*) em ambos os clones de 59 % e 53 %, respectivamente para clones sensível (109A) e tolerante (120) sob condições de déficit hídrico pode ser relacionada a uma diminuição no ciclo de Krebs, diminuindo a conversão do citrato em isocitrato (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Navarre *et al.* (2000) identificaram uma aconitase de tabaco sensível à inativação por óxido nítrico e por espécies reativas de oxigênio, convertendo esta proteína em uma IRP (*Iron responsive element*). Basilion *et al.* (1994) mostraram que existe um aconitase citossólica que contém um domínio funcional IRP (*Iron-regulatory-protein*), sequência DLVIDHSVOQV, que interage com IREs (*Iron-responsive element*). Este domínio está presente em aconitases que se ligam a mRNAs que contém elementos responsivos à ferro (IRE), controlando desta forma a expressão de genes relacionados a homeostase de ferro dentro da célula. O alinhamento múltiplo da sequência traduzida do *contig 9526* (frame +3) com sequências de proteínas de três espécies diferentes, aconitases citosólicas de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*, e aconitase de *Citrus limon* com função IRP mostraram que estas sequências apresentam o domínio funcional relacionado à homeostase de ferro. A proteína codificada pela sequência referente ao *contig 9526* exibiu grande homologia com sequências de outras aconitases citosólicas e mitocondriais, mostrando a presença do domínio funcional de IRP, sugerindo possível papel na regulação de homeostase de ferro. Outro fato importante seria relacionado ao envolvimento de aconitases em eventos de morte celular programada (PDC), porém pouco se sabe ainda realmente sobre o papel na PDC (Moeder *et al.*, 2007). As aconitases possuem domínios ferro-enzofre que seriam perdidos sobre condições de estresses oxidativos, aumentando Fe^{+2} livre no citossol que pode reagir com peróxido de hidrogênio formando radicais livres induzindo a morte celular programada (Navarre *et al.*, 2000). Este fato sugere que esta redução na abundância de aconitases em raízes de

café poderia estar relacionada também com a proteção contra o aumento na produção de radicais livres pela célula sob condições de déficit hídrico.

O aumento dos níveis da proteína enolase (*spots* 16 e 41) favorece o aumento na produção de piruvato pela via glicolítica juntamente com a redução de enzimas relacionadas com etapas posteriores ao piruvato na via glicolítica, como por exemplo, proteínas do complexo da piruvato desidrogenase (*spots* 52 e 55), sugerem um aumento nos teores de piruvato que poderia estar sendo deslocado da via glicolítica para a produção de aminoácidos relacionados com o controle da homeostase celular sob condições de déficit hídrico (Figura 4). O piruvato também é o ativador alostérico da oxidase alternativa (AOX), enzima presente na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria de plantas que catalisa a oxidação do ubiquinol e a redução do oxigênio a água (Onda *et al.*, 2007). Quando a AOX está ativa a fosforilação oxidativa é baixa porque dois sítios de ejeção de prótons para o espaço intermembranas mitocondrial são abortados (Siedow & Umbach, 2000). O aumento nos níveis de piruvato em raízes de plantas de café submetidas a déficit hídrico poderia estar estimulando a ativação de oxidases alternatuvas. Costa *et al.* (2007) em estudos com duas cultivares de *Vigna unguiculata* que exibiam tolerância diferencial a estresses salinos e hídricos, mostraram que existe uma regulação diferencial da atividade dessa enzima na raiz, e na variedade tolerante ocorria um aumento nos níveis de AOX. Maxwell *et al* (1999) mostraram que esta enzima pode estar relacionada com a prevenção na produção de espécies reativas de oxigênio.

O complexo I, uma oxidoreductase do tipo NADH desidrogenase de 600 kDa, é um grande complexo de 40 subunidades presente na membrana mitocondrial como parte integrante da cadeia transportadora de elétrons. Este complexo realiza a oxidação de NADHs na matriz mitocondrial gerados através do ciclo do ácido cítrico, regenerando o NAD^+ e reduzindo ubiquinonas (Buchanan *et al.*, 2002). A redução na abundância relativa da proteína do complexo I, uma subunidade de 76kDa do complexo I mitocondrial (*spot* 5) em 45 % no clone sensível (109A) e de 67 % no clone tolerante (120), sob condições de déficit hídrico sugere uma interrupção na cadeia de transporte de elétrons através desta via (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Sobretudo, como sugerimos anteriormente que estaria ocorrendo uma redução na atividade do ciclo de Krebs, e conseqüentemente diminuição na produção de NADH, este fato pode estar exercendo uma regulação negativa na expressão de proteínas do complexo I nestes clones (Figura 4).

A ATP sintase mitocondrial é um complexo enzimático envolvido diretamente na produção de ATP através de ADP e fosfato inorgânico através da utilização do gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, realizando a fosforilação oxidativa (Boyer, 1997; Stock *et al.*, 1999). A subunidade beta (β) da ATP sintase (*spot* 15) mostrou uma redução de 74 % abundância relativa para o clone sensível (109A) e um aumento de 71 % para o clone sensível (109A) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). A subunidade delta (δ) ou cadeia D da ATP sintase (*spot* 74) mostrou uma redução de 74 % abundância relativa para o clone sensível (109A) e um aumento de 106 % para o clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Nas raízes, a exposição a estresses hídricos eventualmente resulta em um declínio da taxa respiratória (Bryla *et al.*, 1997, 2001). Um dos fatores importantes na regulação de taxas respiratórias sob condições de déficit hídrico são as mudanças induzidas pelo estresse hídrico na demanda por ATP, declínio na demanda de ATP para a respiração (Van den Boogaard *et al.*, 1996). Em algumas espécies como *A. sacabra* a habilidade em tolerar estresse por calor está relacionada ao controle de taxas respiratórias e aumento da eficiência respiratória (Rachmilevitch *et al.*, 2006). O aumento na abundância de ATP sintases no clone tolerante (120) propõe um mecanismo diferencial em relação ao clone sensível (109A) de tolerância a seca através da manutenção ou aumento de taxas respiratórias.

3.2.2 Desenvolvimento e crescimento

A enzima S-adenosil metionina sintetase cataliza a conversão de metionina em S-adenosil metionina, um importante precursor na biossíntese de hormônios como o etileno e poliaminas (Goodwinm & Mercer, 2003). Schoröder *et al.* (1997) observaram em trabalhos com *C. roseus* que transcritos do gene s-adenosil metionina sintetase 2 (*sams2*) são expressos em todos tipos de tecido das plantas. Pierik *et al.* (2006) afirmam que o etileno modula muitos processos internos e respostas de crescimento sob diversos fatores, podendo ser reconhecido como hormônio inibidor do crescimento para algumas espécies, assim como pode ativar o crescimento de raízes laterais para outras espécies. Pinheiro *et al.* (2004, 2005), DaMatta *et al.* (2000) e Silva (2007) mostraram que o clone sensível (109A) exibe um sistema radicular mais ramificado, ou seja, mais lateralizado em relação ao clone tolerante. O aumento desta proteína no clone sensível (109A) em 168 % (*spot* 21) e 27 % (*spot* 58) pode estar relacionado com aumento na abundância da enzima chave de biossíntese de etileno, contribuindo para maiores níveis

de etileno em raízes do clone sensível 109, favorecendo o crescimento de raízes laterais (Figuras 2 e 3; Tabela 1). O clone tolerante apresentou diminuição na abundância relativa em 60 % no *spot* 21, e 64 % para o *spot* 58, sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Sharp *et al.* (2004) e LeNoble *et al.* (2004) sugeriram que a acumulação de ácido abscísico em plantas sob condições de estresses hídricos previne a produção excessiva de etileno. Sabendo-se do *cross-talk* existente entre os hormônios vegetais (Weiss & Ori, 2007; Dugardeyn *et al.*, 2008), estes resultados sugerem uma relação entre o ácido abscísico e a inibição da síntese de etileno em raízes do clone tolerante 120. Silva (2007) mostrou que o clone tolerante (120) exibe maiores concentrações de ABA nas raízes em detrimento do clone sensível (109A). Logo, a diminuição na abundância da enzima S-adenosil metionina sintetase pode estar relacionado a maiores concentrações de ABA nas raízes do clone tolerante, assim como, o aumento no clone sensível relacionado a menores níveis de ABA neste clone.

Giberelina-7-oxidase é uma enzima do tipo dioxigenase, e funcionalmente conhecida por realizar uma β -hidroxilação adicional no primeiro composto da via de biossíntese de giberelinas, o aldeído GA₁₂ (Frisse *et al.*, 2003). A biossíntese de giberelinas se inicia com aldeído-GA₁₂, sendo as etapas seguintes desenvolvidas através de 3 enzimas do tipo dioxigenases, GA-20-oxidase, GA-3- β -hidroxilase, GA-7-oxidase (Lange, 1998). Lange *et al.* (2005) mostraram através de hibridização *in situ* a expressão de transcritos de GA-7-oxidases no ápice radicular de *Curcubita máxima*. As giberelinas são conhecidas pelo seu papel antagônico ao etileno, uma vez que promovem a expansão celular nas raízes e na parte aérea (Kieber *et al.*, 1993). A abundância deste *spot* não foi detectada sob condições de déficit hídrico em ambos os clones (Figuras 2 e 3; Tabela 1). A redução na abundância relativa desta proteína (*spot* 26) sob condições de déficit hídrico sugere que nestes clones as etapas envolvidas na biossíntese de giberelinas poderiam estar sofrendo uma regulação negativa, ou seja, uma redução nos níveis de giberelinas ativas nas raízes destes clones, ou um aumento no nível de giberelinas conjugadas.

As carboxilesterases estão distribuídas em três grupos, classe I, II e III, de acordo com sua atividade. Todas são esterases do tipo β , as que são pertencentes às classes I e II contêm uma estrutura semelhante a hidrolases. As carboxilesterases da classe III são um grupo divergente, pois não possuem a estrutura α , β -hidrolase (Gershtater & Edwards, 2007). As carboxilesterases têm um papel importante na ativação de compostos sinalizadores, como por exemplo, hormônios. Muitos hormônios

acumulam nas células sobre a forma de compostos conjugados para poderem ser transportados até seu local de ação, e assim as carboxilesterases atuam regulando a atividade desses compostos através de reações de hidrólise. As carboxilesterases atuam na atividade do ácido indolacético (AIA) que é conjugado com muitos aminoácidos e açúcares, no qual o resultado do balanço entre formas livres e esterificadas determina a concentração efetiva do hormônio ativo (Woodward & Bartels, 2005). Em milho, foi caracterizada uma carboxilesterase que catalisa a hidrólise do inositol-IAA (Kowalczyk *et al.*, 2003). Marshall *et al.*(2003), usando marcadores isoenzimáticos, demonstraram que múltiplas carboxilesterases estão presentes em plantas, e expressas em muitos tecidos, incluindo folhas, raízes e frutos. Há também, um envolvimento de carboxilesterases na conjugação de açúcares com giberelinas (Schneider *et al.*, 1992). Sob condições de estresse hídrico Sauter *et al.*(2002) observaram um aumento no níveis de ABA conjugado na seiva xilemática, sendo que a concentração de ABA conjugado se apresentava superior as concentrações de ABA livre nestas condições. Algumas carboxilesterases perderam a habilidade de hidrolisar ésteres, e uma carboxilesterase foi identificada em arroz como sendo um acceptor solúvel de giberelina, GID1 (*gibberelin insensitive dwarf1*), codificada pela classe I com sua capacidade hidrolítica perdida, sendo que, as plantas *knock-out* resultaram em plantas com sinalização defeituosa para giberelinas (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005).

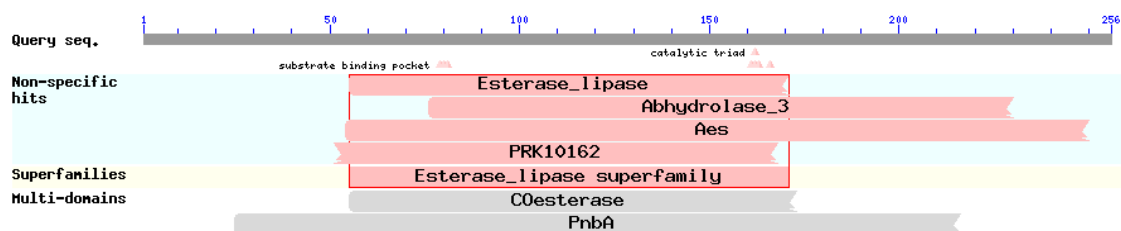


Figura 5. Domínio funcional observado para seqüência traduzida do contig 13933 que apresenta homologia com a proteína carboxilesterase (*spot 66*). Foi utilizada a ferramenta *blastp* no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Domínio Esterase-lipase (cd00312); domínio Abhydrolase3, domínio de $\alpha\beta$ hidrolases (pfam07859); domínio Aes, domínio de esterases lípases pertencentes ao metabolismo de lipídeos (COG0657); domínio PRK10162; acetil esterases (PRK10162); domínio PnbA; carboxilesterases do tipo B (COG2272). Alinhamento referente à proteína putativa localizada no *spot 66*.

Análises de domínios conservados presentes na sequência traduzida do *contig* 13933 mostraram que esta proteína possui domínios de alfa/beta hidrolases, domínios que caracterizam carboxilesterases do tipo B funcionando como hidrolases e acetiltransferases, excluindo a possibilidade dela ser um receptor GID1 de giberelinas, uma vez que ela não perdeu o domínio de hidrolase (Figura 10). A redução na abundância relativa de uma carboxilesterase (*spot* 66) em 47 % no clone sensível (109A) e 54 % vezes no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico sugere uma diminuição de mecanismos relacionados ao balanço entre formas livres e conjugadas de hormônios determinando desta forma a concentração efetiva de hormônios ativos e inativos nas raízes destes clones (Figura 2 e 3; Tabela 1).

A actina é um componente estrutural que faz parte do citoesqueleto celular onde está envolvida em numerosos processos celulares, compondo uma estrutura dinâmica, podendo polimerizar ou despolimerizar na presença de proteínas moduladoras (Ketelaar *et al.*, 2007). Wan *et al* (2005) mostraram que existe uma indução da expressão de actina depois de eventos de estresse abiótico como também em casos de infecção radicular, ocorrendo um rearranjo do citoesqueleto das células. Sabe-se que a actina monomérica possui um papel no complexo de remodelação da cromatina (Zhao *et al.*, 1998), assim como na maquinaria de ativação transcricional (Sotiropoulos *et al.*, 1999). Por outro lado, Yoshimura *et al.* (2008), em trabalhos com raízes de *Citullus sp.* submetidas a déficit hídrico, mostraram a redução na porcentagem em volume da proteína actina mostrando concordância com os resultados deste trabalho. Esta proteína apresentou uma redução no clone sensível (109A) em 58 % (*spot* 23) e 57 % (*spot* 61) sob condições déficit hídrico apresentou (Figuras 2 e 3; Tabela 1). No clone tolerante (120) apresentou uma redução de 64 % (*spot* 23) e 68 % (*spot* 61) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Sabendo-se do envolvimento desta proteína em mecanismos relacionados com a arquitetura e crescimento do sistema radicular, e que evolutivamente as actinas são codificadas por distintas classes gênicas e expressas ao longo de todo tecido radicular (McClean *et al.*, 1990), não é possível fundamentar que a redução na abundância relativa de actinas estaria envolvida na redução da sistema radicular. Os resultados sugerem apenas a ocorrência de eventos relacionados com a mudança da arquitetura e crescimento do sistema radicular neste clones sob condições de déficit hídrico.

Tabela 1. Média da abundância relativa (% volume) das proteínas responsivas ao déficit hídrico em dois clones de *Coffea canephora*.

Spot	Putative Identification ^(a)	DROUGHT-SENSITIVE CLONE (109A) ^(b)			DROUGHT-TOLERANT CLONE (120) ^(b)		
		Irrigated	Non-irrigated	(%)	Irrigated	Non-irrigated	(%)
CARBOHYDRATE METABOLISM							
68	Fructokinase	0,212 ± 0,031	0,000 ± 0,000*	absent	0,206 ± 0,063	0,3211 ± 0,318	56
33	Triosephosphate isomerase	0,559 ± 0,078	0,355 ± 0,037*	36	0,329 ± 0,088	0,191 ± 0,016*	42
16	Enolase	0,576 ± 0,118	0,683 ± 0,212	19	0,292 ± 0,013	0,116 ± 0,106*	60
41	Enolase	0,044 ± 0,023	0,232 ± 0,113*	427	0,000 ± 0,000	0,147 ± 0,019*	present
52	Dihydrolipoamide dehydrogenase E ₃	0,581 ± 0,252	0,249 ± 0,233	57	0,475 ± 0,002	0,269 ± 0,035*	43
55	Dihydrolipoamide acetyltransferase E ₂	0,231 ± 0,060	0,048 ± 0,024*	79	0,2438 ± 0,022	0,096 ± 0,021*	61
4	Aconitase	0,257 ± 0,063	0,105 ± 0,007*	59	0,203 ± 0,004	0,095 ± 0,015*	53
5	76kDa Mitochondrial complex I Subunit	0,110 ± 0,005	0,060 ± 0,023*	45	0,144 ± 0,003	0,048 ± 0,011*	67
15	Mitochondrial F1-ATPase	0,371 ± 0,081	0,095 ± 0,007*	74	0,200 ± 0,055	0,342 ± 0,058*	71
74	ATP synthase D chain mitochondrial	0,398 ± 0,183	0,105 ± 0,030	74	0,0996 ± 0,022	0,205 ± 0,043*	106
GROWTH AND DEVELOPMENT							
21	S-adenosylmethionine synthetase	0,090 ± 0,024	0,241 ± 0,030*	168	0,139 ± 0,084	0,056 ± 0,011	60
58	S-adenosylmethionine synthetase	0,223 ± 0,046	0,283 ± 0,044	27	0,259 ± 0,079	0,094 ± 0,028*	64
26	Gibberellin-7-oxidase	0,262 ± 0,051	0,000 ± 0,000*	absent	0,1194 ± 0,003	0,000 ± 0,000*	absent
66	Carboxylesterase	0,116 ± 0,030	0,061 ± 0,058	47	0,136 ± 0,031	0,062 ± 0,019*	54
23	Actin	0,137 ± 0,023	0,057 ± 0,040*	58	0,180 ± 0,084	0,064 ± 0,011*	64
61	Actin	0,156 ± 0,083	0,067 ± 0,059	57	0,199 ± 0,086	0,063 ± 0,017*	68
PROTEIN PROCESSING							
7	Luminal binding protein (Bip)	0,215 ± 0,051	0,085 ± 0,010*	60	0,199 ± 0,029	0,223 ± 0,153	12
9	Luminal binding protein (Bip)	0,364 ± 0,061	0,095 ± 0,056*	74	0,447 ± 0,121	0,248 ± 0,020*	45
47	Luminal binding protein (Bip)	0,377 ± 0,055	0,2359 ± 0,083	37	0,407 ± 0,016	0,230 ± 0,016*	43
11	Heat shock Protein 70-3	1,387 ± 0,219	0,399 ± 0,292*	71	1,192 ± 0,302	0,340 ± 0,044*	71
42	Heat shock cognate protein 70	1,051 ± 0,201	0,243 ± 0,177*	77	1,259 ± 0,449	0,645 ± 0,497	49
49	Heat shock protein 68	0,187 ± 0,050	0,048 ± 0,026*	74	0,367 ± 0,053	0,156 ± 0,063*	57
50	Chaperonin 60 beta subunit	0,371 ± 0,210	0,185 ± 0,092	50	0,467 ± 0,046	0,232 ± 0,032*	50
35	Chaperonin 21	0,324 ± 0,040	0,215 ± 0,007*	34	0,412 ± 0,008	0,365 ± 0,101	11
2	Cell division cycle protein 48	0,178 ± 0,070	0,068 ± 0,020*	62	0,302 ± 0,088	0,074 ± 0,008*	75
12	Rof 1	0,218 ± 0,013	0,058 ± 0,012*	73	0,280 ± 0,070	0,077 ± 0,017*	73
51	Protein Disulfide isomerase	0,307 ± 0,012	0,542 ± 0,149*	77	0,271 ± 0,010	0,446 ± 0,118	65
64	Disulfide-isomerase precursor-like protein	0,185 ± 0,164	0,112 ± 0,012	39	0,445 ± 0,041	0,141 ± 0,067*	68
39	Mitochondrial processing peptidase	0,059 ± 0,049	0,170 ± 0,053*	188	0,046 ± 0,029	0,125 ± 0,022*	172
18	Peptidase Domain	0,094 ± 0,017	0,201 ± 0,022*	114	0,175 ± 0,053	0,127 ± 0,024	27
63	Putative C2 domain-containing protein	0,243 ± 0,041	0,125 ± 0,076	49	0,260 ± 0,033	0,118 ± 0,026*	55
53	Latex-abundant protein	0,136 ± 0,050	0,000 ± 0,000*	absent	0,063 ± 0,005	0,1768 ± 0,055	181
DEFENSE AND OXIDATIVE STRESS							
80	Dehydrin DH1a	0,000 ± 0,000	0,575 ± 0,264*	present	0,000 ± 0,000	2,589 ± 0,142*	present
69	DRT102 (DNA-Damage-repair/Tolerance 2)	0,172 ± 0,015	0,127 ± 0,029	26	0,182 ± 0,032	0,084 ± 0,019*	54
13	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	0,057 ± 0,046	0,268 ± 0,039*	370	0,037 ± 0,012	0,128 ± 0,049*	246
14	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2	0,180 ± 0,056	0,327 ± 0,059*	82	0,296 ± 0,067	0,163 ± 0,007*	45
59	Monodehydroascorbato reductase	0,104 ± 0,066	0,248 ± 0,080	138	0,081 ± 0,038	0,175 ± 0,023*	116
25	Aldo/Keto reductase AKR	0,361 ± 0,022	0,171 ± 0,049*	53	0,171 ± 0,010	0,136 ± 0,021*	20
67	Aldo/keto reductase	0,524 ± 0,064	0,612 ± 0,471	17	0,551 ± 0,175	0,234 ± 0,006	58
79	Aldo/keto reductase	0,143 ± 0,008	0,392 ± 0,158*	174	0,202 ± 0,010	0,267 ± 0,064	32
0	Major allergen Mal d 1.04	1,064 ± 0,188	0,372 ± 0,071*	65	0,580 ± 0,242	0,184 ± 0,010*	68
75	Major allergen Mal d 1.0501	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	absent	0,472 ± 0,072	0,000 ± 0,000*	absent
76	Major allergen Mal d 1.1.0501	0,186 ± 0,018	1,474 ± 0,037*	692	0,479 ± 0,101	1,570 ± 0,323*	228
77	Major allergen protein homolog	3,321 ± 0,051	2,473 ± 0,333*	26	2,907 ± 0,773	1,071 ± 0,358*	63
78	Major allergen Mal d 1.1.0501	3,633 ± 0,058	2,703 ± 0,143*	26	3,933 ± 0,046	1,045 ± 0,032*	73
38	Pathogenesis-related protein PR10	0,583 ± 0,525	0,140 ± 0,010	76	0,399 ± 0,106	0,000 ± 0,000*	absent
32	Chitinase 3-like protein precursor	2,525 ± 0,203	0,713 ± 0,012*	72	1,625 ± 0,025	2,336 ± 0,229*	44
NO DEFINITE FUNCTION							
3	Unnamed Protein product	0,203 ± 0,041	0,071 ± 0,010*	65	0,313 ± 0,071	0,067 ± 0,004*	79
8	Unknown protein	0,103 ± 0,018	0,057 ± 0,010*	45	0,114 ± 0,009	0,062 ± 0,019*	46
10	Unknown protein	0,313 ± 0,049	0,137 ± 0,058*	56	0,275 ± 0,007	0,086 ± 0,004*	69
17	Os09g0375000	0,174 ± 0,074	0,050 ± 0,004	71	0,214 ± 0,052	0,051 ± 0,008*	76
28	OSJNB0088C09.11	0,624 ± 0,179	1,670 ± 0,265*	168	1,231 ± 0,453	2,983 ± 0,004*	142
29	Hypothetical protein	0,214 ± 0,084	0,072 ± 0,004*	66	0,199 ± 0,040	0,1593 ± 0,058	20
54	Unnamed protein product	0,000 ± 0,000	0,110 ± 0,114*	present	0,057 ± 0,007	0,104 ± 0,007*	82
57	Unknown protein	0,358 ± 0,073	0,453 ± 0,302	27	0,171 ± 0,040	0,273 ± 0,128	60
62	Unknown protein	0,609 ± 0,195	1,253 ± 0,196*	106	0,387 ± 0,103	0,643 ± 0,049*	66
70	Unkown protein	0,248 ± 0,162	0,086 ± 0,006	65	0,165 ± 0,066	1,021 ± 0,366*	519

Os valores representam as médias da porcentagem em volume (abundância relativa) ± o desvio padrão de três replicatas biológicas. Condições irrigadas (I) e condições não-irrigadas (NI). As barras azuis significam em porcentagem o quanto a abundância protéica aumentou na condição não-irrigada em relação a condição tratada em porcentagem. As barras vermelhas significam em porcentagem o quanto a abundância protéica diminuiu na condição não-irrigada em relação a condição tratada. Os asteriscos significam que sob efeito de tratamento a abundância protéica diminuiu ou aumentou significativamente nas plantas não-irrigadas. As médias diferem entre si estatisticamente segundo Teste T de Student com nível de significância $p \leq 0,05$.

3.2.3 Proteínas envolvidas no processamento proteico

As *heat-shock-proteins* (HSPs) são chaperones moleculares associadas a membranas celulares divididas em classes de acordo com homologia e peso molecular. Encontram-se localizadas em diversos compartimentos sub-celulares como citossol, retículo endoplasmático, plastídeos e mitocôndrias (Sung & Guy, 2003). As chaperones HSP 70, HSP60 e HSP68 estão envolvidas em etapas de processamento proteico, transporte através da membrana, modulação da atividade de algumas proteínas e ainda prevenção de agregação irreversível de algumas proteínas (Su & Li, 2008). *Luminal binding protein* (BiP) é uma chaperone presente no retículo endoplasmático que tem papel importante na translocação através da membrana do retículo endoplasmático, no processamento e maturação de proteínas sintetizadas (Cascardo *et al.*, 2001). Pode ser encontrada nas formas interconvertíveis oligomérica e monomérica, sendo pós-traducionalmente modificada e regulada por ribosilação e fosforilação (Carlsson & Lazarides, 1983; Hendershot *et al.*, 1988). As chaperones são expressas em resposta ativação da via de sinalização *Unfolded Protein Response* (UPR) ativada pela acumulação de proteínas mal-dobradas no retículo endoplasmático (Horváth *et al.*, 2008). Esta via ativa a transcrição coordenada de um conjunto de genes envolvidos no restabelecimento da homeostase no retículo endoplasmático. Liu *et al.* (2002) e Costa (2007) mostraram que alguns fatores transcricionais ativados pela via UPR regulam a transcrição e atividade de inúmeras chaperones moleculares, genes relacionados ao *endoplasmatic reticulum associated degradation* (ERAD), e de proteínas secretórias. Lin *et al.* (2007) mostraram que em mamíferos a expressão de fatores transcricionais ativados pela UPR é alta em estágios iniciais de doenças com função de proteção celular, mas que em fases ainda mais tardias a expressão de fatores transcricionais ativados pela UPR é drasticamente reduzida e a célula começa a exibir mecanismos relacionados com a expressão de proteínas relacionadas a morte celular programada (Figura 6). As chaperones (*spots* 2, 7, 9, 11, 35, 42, 47, 49, 50) apresentaram uma redução na abundância relativa nos dois clones, com exceção dos *spots* 7 e 64 que aumentaram somente no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Os resultados mostram que a diminuição na abundância de chaperones moleculares pode ser uma consequência da diminuição de fatores transcricionais ativados pela via UPR que teriam sua expressão reduzida diante de estresses mais severos (Tabela 1). Sabe-se que a morte celular programada é um processo celular que

esta envolvida na defesa e é seguido de uma diminuição de proteínas relacionadas a proteção celular e ainda o aumento de outras proteínas como as caspases (Reape & McGabe, 2008). Desta forma, a redução na abundância de chaperones moleculares em conjunto com o aumento na abundância relativa de uma proteína com domínio funcional de caspases (*spot 63*) no clone tolerante (120) sugere a ocorrência de eventos de morte celular programada neste clones durante estágios severos de déficit hídrico (Figura 6).

Sato & Yokoya (2008) mostraram que a superexpressão de uma HSP 17.7 aumenta a tolerância ao déficit hídrico em folhas *Oryza sativa* submetidas a estresse osmótico por polietileno glicol. Sung *et al.* (2001) observaram que a super-expressão de uma HSP70 citossólica em folhas resultou no aumento de tolerância a estresse abiótico. A maioria dos trabalhos apresenta HSPs como um grupo de proteínas que são induzidas em condições de estresse e com função de proteção e reparo de danos causados por diversos tipos de estresses (Liu *et al.*, 2007; Su & Li, 2008; Sato & Yokoya, 2008). Guimarães (2007) mostrou um aumento de varias HSPs em folhas de *Coffea canephora* sob condições de déficit hídrico severo (- 3,0 MPa). Entretanto, os resultados aqui apresentados mostraram uma redução significativa na abundância relativa destas chaperones em raízes quando submetidas a condições de déficit hídrico, o que aparentemente parece ser contraditório em relação aos trabalhos citados acima. Porém, Irsigler *et al.* (2007) mostraram em experimentos com microarranjos em folhas de *Glicine max* que os genes que codificam chaperones do retículo endoplasmático e outras proteínas ligadas ao processamento protéico, como a proteína BiP, são de forma opostas afetadas por estresse osmótico induzido por polietileno glicol (PEG), apresentando redução nos níveis de expressão sob estas condições. Além disso, análises na expressão gênica relacionada a estresses por PEG também foram relatadas em milho, onde mostraram uma grande diminuição da expressão de transcritos relacionados com biossíntese de proteínas (Jia *et al.*, 2006). Existem ainda evidências de que estresses abióticos causem uma progressiva redução na montagem dos polissomos causando redução na iniciação da tradução de proteínas (Kawaguchi *et al.*, 2003, 2004). Bogeat-Triboulot *et al.* (2007) mostraram que em *Populus euphratica* o número de genes com o nível de transcrição alterado aumenta com a severidade do estresse, e que nas raízes as mudanças ocorrem tardiamente e predominantemente consistem na diminuição da abundância de transcritos. Diferentes redes de genes são envolvidas nas raízes e na parte aérea, e mudanças na expressão gênica e tradução aumentam de acordo com a severidade do estresse, e podem apresentar respostas diferentes em cada órgão (Bogeat-

Triboulot *et al.*, 2007). Desta forma, a redução na abundância relativa de chaperones pode estar relacionada à inabilidade de raízes de *Coffea canephora* de ativar processos de proteção contra seca nestas condições. As seqüências de peptídeos das proteínas BiPs referentes aos *spots* 7, 9 e 47 apresentaram peso molecular experimental menor que peso molecular teórico. O alinhamento entre a seqüência traduzida do *contig* 9848 (*spots* 7, 9 e 47) e a seqüência da proteína BiP de *Arabidopsis thaliana* (dbj|BAA_12348.1|)(dados não apresentados) mostrou que o primeiro possui uma seqüência de 874 aminoácidos, e o segundo 668 aminoácidos, o que explica a diferença encontrada entre os pesos moleculares e sugere ocorrência de eventos de processamento protéico, como por exemplo, *splicing* alternativo, não evidenciados na tradução da seqüência do *contigs* ou também erro na montagem do *contig*. Outro caso semelhante ocorreu com a seqüência de peptídeos da chaperonina 60 (*spot* 50), onde foi verificado também peso molecular experimental menor que peso molecular teórico.

CDC48 é uma proteína com função de chaperone, também designada chaperone Grp97, encontrada em células eucarióticas (Jentsch & Rumpf, 2006) e que possui inúmeras funções celulares. Alguns trabalhos mostram que CDC48 está envolvida em etapas de ativação dependente de ubiquitinação em alguns fatores transcricionais (Hitchcock *et al.*, 2001; Hoppe *et al.*, 2000), degradação de proteínas no retículo endoplasmático pela via ERAD (*Endoplasmatic-Reticulum-associated degradation*) (Rabinovich *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2002) (Figura 6), e ainda possuem função em etapas de controle da fusão de membranas (Raasi & Wolf, 2007; Kano *et al.*, 2005). Irsigler *et al.* (2007), em trabalhos com folhas de soja, observaram redução na expressão do gene relacionado com a expressão de CDC48 em resposta à estresse osmótico. Esta proteína (*spot* 2) teve seus níveis reduzidos em ambos os clones, comportamento este semelhante às outras proteínas chaperones que também se apresentaram reduzidas sob condições de déficit hídrico. A redução na abundância da proteína CDC 48 em 62 % para o clone sensível (109A) e 75 % no tolerante (120) sob condições de déficit hídrico (Figura 2 e 3; Tabela 1) pode estar relacionada com sua função de chaperone molecular e ainda que estaria ocorrendo uma redução na abundância em virtude da redução na síntese protéica em geral como já foi observada para raízes de outras espécies em condições de déficit hídrico (Kawaguchi *et al.*, 2003, 2004; Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007).

As proteínas codificadas pelo gene *rofl* (*Raffinose Olygossacaride Family*) são rotamases do tipo peptidilprolil isomerases, também chamadas de peptidilpropil *cis*-

trans isomerases (PPIases) ou *FK-binding* de acordo com análise no banco de proteínas do NCBI (10/05/2008). PPIases são enzimas que aceleram dobramento protéico através da catalização de uma *cis-trans* isomerização de pontes peptídicas de prolinas em oligopeptídeos (Fisher *et al.*, 1990). Aviezer-Hagai *et al.* (2007) mostraram com trabalhos em *Arabidopsis thaliana* que transcritos de rofl são expressos em sistemas vasculares tanto nas raízes principais como nas raízes laterais, tanto em zonas de alongação como nos ápices, e quando submetidas à estresse por calor observaram um aumento no número de transcritos nessas regiões. Estes mesmos autores mostraram que esta proteína exibe domínios funcionais de ligação a algumas HSP90 funcionando como co-chaperones envolvidas em resposta a estresses abióticos. A redução na abundância relativa de uma proteína do tipo PPIase (*spot* 12) em 73 % em ambos os clones sob condições de déficit hídrico, dando destaque ao papel desta proteína como uma co-chaperone, pode estar relacionada com a redução nos níveis de praticamente todas as chaperonas moleculares identificadas neste trabalho (Figuras 2 e 3; Tabela 1).

As pontes dissulfídicas fornecem estabilidade às proteínas por ligações covalentes entre duas cisteínas (Xiao *et al.*, 2004), sendo que esta mudança pós-traducional ocorre no retículo endoplasmático onde um complexo de enzimas promove a formação correta dissulfídica. Huang *et al.* (2005) afirmaram, através de experimentos com *Ipomea batatas*, que o padrão de expressão em vários órgãos e atividade *in vitro* da enzima dissulfida isomerase (PDI) sugere uma função antioxidante desta proteína em raízes. Irsigler *et al.* (2007) mostraram que em folhas de tabaco ocorre uma redução na expressão gênica de PDIs relacionadas a estresse do retículo endoplasmático, enquanto que existe um aumento na expressão gênica de PDIs quando as plantas são submetidas a estresse osmótico. Farquharson (2008) mostrou que proteínas PDIs podem estar envolvidas na regulação dos eventos de morte celular programada em plantas. Minami & Fukuda (1995) já tinham proposto que as PDIs atuam bloqueando a atividade de proteases. A redução na abundância relativa de duas PDIs no clone sensível (109A) em 77 % (*spot* 51) e 39% (*spot* 64) e ainda de uma PDI (*spot* 64) em 68 % no clone tolerante (120) mostra que provavelmente com a redução da abundância destas proteínas estaria ocorrendo também uma diminuição na inibição de proteases, e consequentemente um aumento em eventos de morte celular programada neste clone (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Já o aumento de 65 % de uma PDI (*spot* 51) no clone tolerante (120) sugere que neste clone pode estar ocorrendo um aumento na inibição da atividade

de proteases que estariam contribuindo para uma redução de eventos de morte celular programada.

Mitochondrial processing peptidase (MPP) é uma enzima que catalisa a clivagem de pré-sequências, sinais reconhecidos para importação de proteínas precursoras para dentro da mitocôndria (Hartl & Neupert, 1990). Muitas proteínas mitocondriais são codificadas por genes nucleares, sendo sintetizadas como precursores por ribossomos no citossol da célula, e logo após importados pela organela (Wiedemann *et al.*, 2004). Foi observado um aumento na abundância relativa de uma MPP (*spot* 39) em 188 % no clone sensível (109A) e 172 % no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Uma vez que foi observada uma redução na abundância da maioria das proteínas com expressão diferencial sob condições de déficit hídrico, o aumento desta proteína provavelmente não está relacionado a um maior processamento de proteínas mitocondriais que são sintetizadas no citossol uma vez que foi observada uma redução na síntese da maioria das proteínas. Provavelmente, esta proteína tem sua ação no conjunto com complexo citocromo bc₁, funcionando ambos como transportadores de elétrons e processamento de peptídeos como já foi relatado por Glaser & Dessi (1989), sugerindo que um papel funcional relacionado ao transporte de elétrons mitocondrial seria a provável função desta proteína nestas condições.

Peptidase dimerization domain é uma domínio funcional comumente encontrado em peptidases, um domínio que consiste em quatro alças-beta e duas alfa-hélices que realizam a dimerização de membros de uma família de peptidases composta por carboxipeptidases, dipeptidases e aminopeptidases (*InterPro*, 17/05/2008). O *spot* 18 que apresenta homologia com a sequência do *contig* 17453 que apresenta maior identidade com a sequência do domínio funcional *peptidase dimerization domain* comumente encontrado em peptidases, sugerindo que esta proteína seria uma peptidase, segundo dados consultados no NCBI (17/05/2008) (Figuras 2 e 3; Tabela 2). As peptidases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas realizando a clivagem proteolítica que atua na ativação e desativação de moléculas, sendo este mecanismo importante na sinalização de processos celulares como a morte celular programada em plantas (Hedstrom, 2002). Sabendo-se da função proteolítica das peptidases como sinalizadoras de processos celulares, o aumento na abundância relativa desta peptidase (*spot* 18) em 114 % no clone sensível (109A) e 27 % no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico está provavelmente relacionado a etapas de sinalização e ativação de processos relacionados a morte celular

programada nestes clones (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Como já foi proposto anteriormente, estaria ocorrendo uma redução no ciclo de Krebs, e ainda um aumento de proteólise que estaria contribuindo para um aumento de aminoácidos livres nas células e estes seriam deslocados para o aumento no pool de hexoses, uma vez que estaria ocorrendo uma redução no processamento protéico acompanhado de uma redução na tradução de chaperones moleculares.

O domínio funcional C2 é um motivo de ligação de cálcio presente em proteínas do tipo fosfolipases e proteínas cinases C, proteínas que se ligam à fosfolipídeos, inositol polifosfastos e proteínas intracelulares que são importantes na sinalização celular (*NCBI- Conserved Domains*, 17/05/2008). O *spot* 63 apresentou um aumento na abundância de 49 % no clone sensível (109A) e redução de 55 % no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Os resultados sugerem um aumento de proteínas do tipo fosfolipases e cinases no clone sensível e uma diminuição destas no clone tolerante. Portanto, estaria ocorrendo um controle diferencial nas vias de sinalização nestes clones.

Latex-abundant protein é uma proteína que apresenta regiões homologas às caspases do tipo *ICE* (*Interleukin-1 beta converting enzyme*) segundo dados referentes ao número de acesso da proteína (Tabela 2). A morte celular programada envolve vias de sinalização que controlam a destruição das células (Pallavan-Unsal *et al.*, 2003), sendo bem caracterizada em animais, também chamada de apoptose, porém pouco se sabe ainda sobre os mecanismos envolvidos em plantas (Bonneau *et al.*, 2008). Existem duas vias que controlam a morte celular programada resultando na ativação de caspases. Uma via dependente da mitocôndria que libera vários fatores apoptóticos, e outra independente da mitocôndria que envolve a participação de receptores específicos (Costa *et al.*, 2007). O aumento na abundância da uma proteína homóloga a caspases (*spot* 63) no clone tolerante (120) em 181% sugere que eventos de morte celular programada podem estar ocorrendo sob condições de déficit hídrico uma vez que esta proteína tem um papel fundamental neste processo (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Lin *et al.* (2007) observaram que durante eventos de morte celular programada ocorre uma diminuição drástica da expressão de fatores transcricionais envolvidos na expressão de chaperones celulares. Sobretudo, este fato pode ser associado à redução na abundância relativa sob condições de déficit hídrico de quase todas as proteínas chaperones identificadas neste trabalho mostram mais uma evidência da ocorrência de eventos de morte celular programada (Figura 6). A diminuição na abundância desta proteína no

clone sensível (109A) não exclui a possibilidade de este clone estar também realizando eventos de morte celular programada. O *spot 53* não foi detectado nos géis bidimensionais do clone sensível (109A) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1).

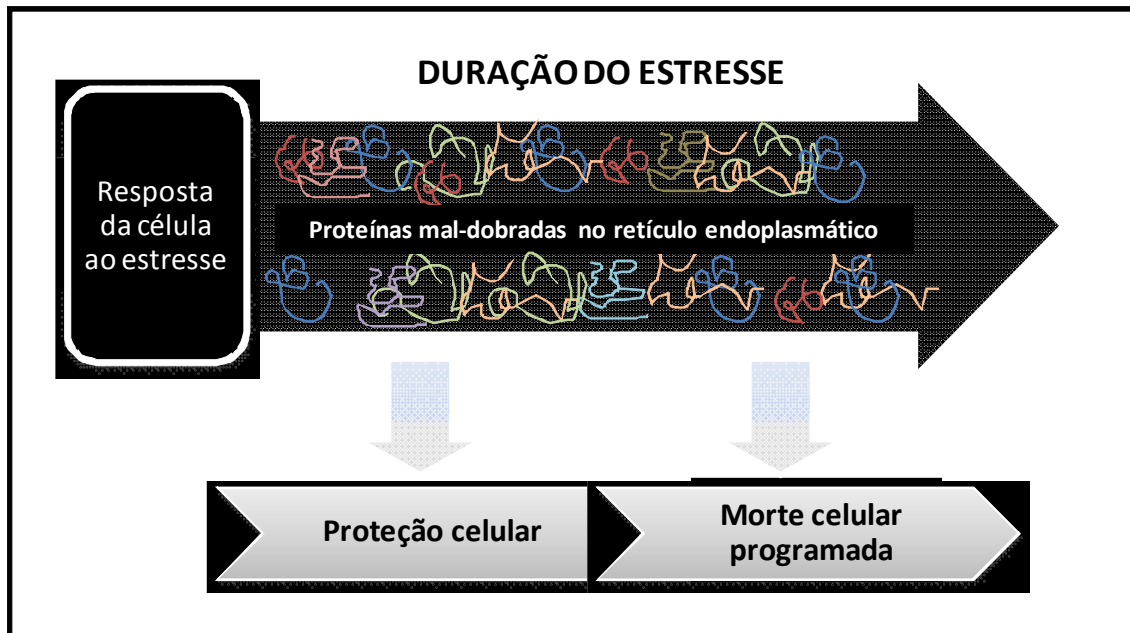


Figura 6. Resposta da célula ao estresse de acordo com a duração do estresse. Adaptada de Lin *et al.*, 2007.

3.2.4 Proteínas relacionadas com defesa e estresse oxidativo

As deidrininas são originalmente identificadas como sendo proteínas pertencentes ao grupo II das proteínas *late embryogenesis abundant* (LEAs) e possuem um domínio conservado rico em lisina composto por 15 aminoácidos, EKKGIMDKIKEKLPG (Rorat, 2006). O alinhamento múltiplo entre a sequência traduzida do *contig* 11466, a sequência de uma deidrina DH1alfa de *Coffea canephora* (gb|ABC01886.1|) e a sequência do domínio funcional representativo de proteínas LEA do tipo deidrininas mostrou a presença do domínio conservado nas sequências alinhadas, mostrando também a grande similaridade exibida entre as duas sequências alinhadas (Figura 14). De acordo com a literatura, as deidrininas são proteínas que tem sua acumulação aumentada em tecidos em resposta às condições de déficit hídrico (Close, 1997; Allagulova *et al.*, 2003). Close *et al* (1997) mostraram que estas proteínas podem

funcionar como moléculas surfactantes, agindo sinergicamente como solutos compatíveis prevenindo a coagulação de colóides e outras moléculas. Deidrinhas mostraram desempenhar mudanças conformacionais na interface membrana/água, relacionada à estabilização de vesículas ou outras estruturas de endomembranas sob condições de estresse celular (Koag *et al.*, 2003). A super-expressão de deidrinhas em plantas transgênicas é suficiente para aumentar a tolerância a seca, como por exemplo, milho transgênico super-expressando o gene *hav1* de cevada tornam-se resistentes ao déficit hídrico (Xu *et al.*, 1996). A expressão da proteína deidrina (*spot* 80) no clone tolerante (120) em condições de déficit hídrico apresentou aumento cerca de cinco vezes maior que a expressão no clone sensível (109A) em condições de déficit hídrico e provavelmente este fato está relacionado a maior tolerância a seca encontrada no clone tolerante em relação ao clone sensível (Figuras 2 e 3; Tabela 1).

DNA-Damage-repair/toleration 2 (DRT102) segundo consulta realizada no banco de dados do *GRAMENE* (17/05/2008) é uma proteína apresenta-se como idêntica a uma DRT102 encontrada em *Coffea canephora*.. Segundo NCBI (17/05/2008), esta proteína possui um domínio funcional para isomerização de riboses e galactoses. De acordo *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>, 17/05/2008) esta proteína possui funções como regulação negativa de caspases (acesso: GO0043154). Bae *et al.*, (2003) mostraram em trabalhos com *Arabidopsis thaliana* uma expressão diferencial de DRT102 em condições de estresse por frio. A redução na abundância relativa de uma DRT102 (*spot* 69) em 26 % no clone sensível (109A) e 54 % no clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico aparentemente parece ser contraditória uma vez que ocorreu o aumento de uma caspase (*spot* 53), porém não descarta a possibilidade do envolvimento em outras vias não-relacionadas às funções discutidas acima (Figuras 2 e 3; Tabela 1).

A proteína aldeído desidrogenase mitocondrial pertence a uma família de enzimas dependente de NADP^+ com uma ampla afinidade por substratos e responsável por catalisar a oxidação de aldeídos tóxicos e ácidos carboxílicos (Sunkar *et al.*, 2003). Aldeídos tóxicos compreendem a maior porção de produtos originados da peroxidação lipídica e o aumento na atividade da enzima aldeído desidrogenase representa uma das estratégias de defesa na detoxificação (Yoshida *et al.*, 1998). Irsigler *et al.* (2007) mostraram um aumento na expressão de genes codificadores de aldeído desidrogenases sob condições de estresse osmótico causado por tratamentos com polietileno-glycol (PEG) em plantas de soja. Ocorreu um aumento na abundância relativa de uma proteína

aldeído desidrogenase (*spot* 13) para ambos os clones sob condições de déficit hídrico, 370 % para clone sensível (109A) e 246 % para o clone tolerante (120), e outra aldeído desidrogenase (*spot* 14) apresentou aumento na abundância em 82 % para o clone sensível, porém uma redução em 45 % para o clone tolerante (Figuras 2 e 3; Tabela 1). Desta forma, o aumento na abundância relativa desta proteína nos clones sensível (109A) e clone tolerante (120) sugere papel importante na detoxificação de aldeídos tóxicos gerados sob condições de déficit hídrico, e mostra a contribuição desta enzima no processo de aclimatização nos dois clones de *C. canephora*.

A proteína monodeidroascorbato redutase desempenha um papel importante na defesa contra peróxidos gerados em organelas como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Potters *et al.*, 2002). A expressão diferencial da proteína monodeidroascorbato redutase (MDAR) foi detectada em raízes de *Manihot esculenta* em trabalho realizado por Sheffield *et al.* (2006). MDAR em conjunto com as enzimas deidroascorbato redutase e glutathione redutase são consideradas enzimas importantes em mecanismos de defesa contra estresses oxidativos em plantas (Eltayeb *et al.*, 2007). Lunde *et al.* (2006) destacou aumento da expressão de uma MDAR citossólica sob condições de déficit hídrico sugerindo que evolutivamente esta proteína desenvolve um papel essencial na proteção em estresses abióticos. O aumento da abundância de uma monodeidroascorbato redutase (*spot* 59) de 138 % no clone sensível (109A) e 116 % no clone tolerante, sob condições de déficit hídrico provavelmente está relacionado ao papel antioxidativo desta enzima em mecanismos de proteção contra estresse oxidativos gerados sob condições de déficit hídrico nestes clones (Figuras 2 e 3; Tabela 1).

As aldo/ceto redutase (AKRs) são proteínas que pertencem a uma superfamília que incluem aldeído redutases e aldoses redutases caracterizadas como oxiredutases citosólicas dependentes de NADPH com papel importante na redução de uma variedade de compostos carbonil (Morita *et al.*, 2007). Oberschall *et al.* (2000) mostraram que plantas transformadas super-expressando aldo/ceto redutases apresentavam uma redução na peroxidação lipídica sob condições de estresses hídricos. Bohren *et al.* (1989) mostraram que alguns genes ativados em condições de estresses estão relacionados à famílias de aldo/ceto redutases. Mundree *et al.* (2000), em trabalhos com *Xerophyta viscosa*, conhecida como planta de ressurreição tolerante à dissecação, mostrou a expressão de uma AKR sob condições de desidratação. Hideg *et al.* (2003) em experimentos com tabaco sob condições de radiação ultravioleta e déficit hídrico

mostraram um papel importante de aldeídos redutases na detoxificação contra peroxidação lipídica. Uma AKR (*spot* 25) apresentou uma redução na abundância em 53 % no clone sensível (109A) e 20 % no clone tolerante (120) sob condições de estresse hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). E outra AKR (*spot* 67) apresentou aumento da abundância em 17 % para o clone sensível (109A), entretanto apresentou redução na abundância em 58 % para o clone tolerante (120) sob condições de estresse hídrico. E ainda uma terceira AKR (*spot* 79) apresentou um aumento da abundância de 174 % o clone sensível (109A) e de 32 % para o clone tolerante (120) sob condições de déficit hídrico (Figuras 2 e 3; Tabela 1). O aumento na abundância desta enzima em alguns *spots* sugere envolvimento na detoxificação de aldeídos tóxicos geradas sob condições de déficit hídrico nestes clones, e pode estar relacionada aos mecanismos de aclimação.

As proteínas relacionadas com infecção por patógenos, proteínas PR (*pathogenesis-related protein*), são codificadas por genes do tipo *Ypr*, atuando na defesa à invasão por patógenos causando indução da transcrição de proteínas responsivas à patógenos (Bishop *et al.*, 2000). São divididas em várias classes e famílias gênicas que desempenham várias funções específicas (Van-Lon *et al.*, 2006). Muitos desses genes são transcricionalmente ativados em condições de estresses bióticos (Warner *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1996). A proteína *major allergen Mal d* é uma proteína do tipo PR10 (*pathogenesis-related protein*) codificada pelo gene *Ypr10* e tem função de ribonuclease (Van-Loon *et al.*, 1994; Moiseyev *et al.*, 1997). As quitinases são proteínas também incluídas nas famílias PR 3, 4 e 11 de acordo com o gene que as codifica, sendo o *spot* 32 uma quitinase do tipo III, codificada por genes *Ypr8* (Van-Lon *et al.*, 2006). Algumas evidências suportam a hipótese de que estas proteínas têm um papel na tolerância a estresses abióticos (Gaudet *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2007). Estudos realizados por Lee *et al.* (2008) mostraram que tanto os parâmetros morfofisiológicos, quanto proteínas PR induzidas em condições de seca, ajudam as plantas a resistir e se recuperar em estresses abióticos moderados. Adicionalmente, em estresses terminais severos, o efeito benéfico pode não operar e a acumulação dessas proteínas pode ter efeito negativo no crescimento da planta. A redução na abundância relativa de algumas PRs (*spots* 0, 38, 75, 76 e 78) pode estar relacionada ao estresse severo onde provavelmente está ocorrendo uma redução nos processos de proteção celular e, acompanhado de eventos de morte celular programada (Figuras 2 e 3; Tabela 1). O

aumento na abundância relativa de algumas proteínas PRs (*spots* 32 e 76) pode ter sido causado por algum tipo de estresse biótico como infecção por patógenos.

Devido às limitações das técnicas usadas na construção de bibliotecas de EST, foram encontradas seqüências de *contigs* maiores que a seqüência da proteína com maior identidade, como por exemplo, a seqüência do *contig* 17950 que apresentou homologia com uma seqüência de uma enolase (*spots* 16 e 41) (Tabela 1 e 2), fato este relacionado a baixa eficiência durante os eventos de clonagem (Vieira *et al.*, 2006). Existem vários eventos como regulação pós-transcricionais e *splicing* alternativo que podem ocorrer, e assim não estão inclusos nas seqüências referentes aos seis *frames* de possível tradução para os *contigs*, ocasionando uma redução na identificação por homologia. O banco de café apresenta um total de 153.739 seqüências, das quais 85,08 % pertencem a *Coffea arabica* 8,05% são de *Coffea canephora* e 6,87% são de *Coffea racemosa* (Vieira *et al.*, 2006). O reduzido número de seqüências referentes a *Coffea canephora* pode ter contribuído para a baixa homologia ou nenhuma homologia verificada para alguns peptídeos.

Dentre as proteínas identificadas, algumas foram representadas por mais de um *spot* nos géis bidimensionais com ponto isoelétrico (pI) e/ou peso molecular experimental diferente do pI e/ou peso molecular teórico. Todos esses resultados denotam a presença de modificações pós-traducionais, ocorrência de variações alélicas de uma mesma proteína, variações isoenzimáticas, ou eventos de *splicing* alternativo. Onde foi observado peso molecular experimental menor que o teórico pode estar ocorrendo eventos de processamento protéico, como por exemplo, na proteína triose fosfato isomerase (*spot* 33) (Tabelas 1 e 2).

Quando o peso molecular experimental foi maior que o teórico, por se tratar de homologia com bancos de *ESTs*, muitas seqüências podem estar incompletas. Por se tratar de um banco de EST muitas seqüências podem estar incompletas ou pode haver ocorrido algum tipo de erro na montagem nas bibliotecas de *contigs* (Tabela 2).

Um grande número das proteínas identificadas apresentou homologia com seqüências de espécies de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* (Tabela 1). Estas espécies apresentam um grande número de seqüências de proteínas e genes depositados em bancos públicos de dados como NCBI-nr, e desta forma a homologia indica que essas proteínas são altamente conservadas entre espécies lenhosas e não-lenhosas. Somente uma proteína apresentou homologia com *Coffea canephora*, uma justificativa seria o reduzido número de seqüências

relacionadas a esta espécie em bancos públicos, sendo que muitas ainda não foram caracterizadas funcionalmente.

Tabela 2. Identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF) de proteínas diferencialmente expressas em raízes de clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico.

Spot	Putative Identification ^(a)	Contig ^(b)	Frame ^(c)	Accession no. ^(d)	Species	Theo. ^(e) pI/Mass (kDa)	Exp. ^(f) pI/Mass (kDa)	e-value ^(g)	Peptide(s) matched
CARBOHYDRATE METABOLISM									
68	Fructokinase	4270	+1	gb AAB51108.1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	6.2/47.6	5.3/38	1e-158	IVDNQAIIDEAR AAGVLLSYDPNLR LPLWPSAEER APGGAPANVAIVAR
33	Triosephosphate isomerase	1865	+1	emb CAA58230.1	<i>Petunia x hybrida</i>	7.8/35.3	6.39/29	1e-115	LILGESNEFVGDKVAYALSR WLHANISPEVAASR VATPAQAQEVHAELRK
16	Endlase	17950	+3	emb CAA41115.1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	5.6/64.4	6.16/51	0	VNQIGSVTESIEAVR LVLVPVAFNVINGGSHAGNK IEEELGADAIYAGASFR GNPTVEVDVHVSNGVWAR
41	Endlase	17950	+3	emb CAA41115.1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	5.06/64.4	6.09/52	0	IEEELGADAIYAGASFR
52	Dihydrolipoamide dehydrogenase E ₃	9621	+1	dbj BAB44156.1	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	8.3/74.6	6.83/56	0	SLPGVAIDEQR ALLHSSHMFHEAK
55	Dihydrolipoamide acetyltransferase E ₂	10789	+1	dbj BAB02323.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8.5/70.9	5.47/50	0	KVPQCNSSWTNDYIR VIDGAIGAEWLK
4	Aconitase	9526	+3	dbj BAA06108.1	<i>Cucurbita maxima</i>	8.8/128.8	6.54/99	0	SAGQDTIILAGTEYCGSGSR
5	76kDa Mitochondrial complex I Subunit	9707	+1	emb CAA59818.1	<i>Solanum tuberosum</i>	5.6/30.7	6.3/78	1e-151	NWELKGTESIDVTDVAGSNIR
15	Mitochondrial F1-ATPase	16839	+1	dbj BAA01372.1	<i>Oryza sativa</i>	6.4/76.9	5.0/52	0	QISELGYPVAVDPLDSTSR IPSAVGYQPTLATDLGGLQER VVDLLAPYQR MLSPHILGEDHYNTAR

Tabela 2. Continuação

Spot	Putative Identification	Contig	Frame	no. Acesso	Espécie	Teórico pI/Mass (kDa)	Exp. pI/Mass (kDa)	e-value	Peptide(s) matched
74	ATP synthase D chain mitochondrial	12102	+3	gb AAT40531.1	<i>Solanum demissum</i>	6.0/31.4	5.01/24	2e-73	FSQEPEPIDWEFYR
GROWTH AND DEVELOPMENT									
21	S-adenosylmethionine synthetase	9985	+2	emb CAA95856.1	<i>Catharanthus roseus</i>	7.9/74.5	5.93/46	0	FVIGGPHGDAGLTGR
58	S-adenosylmethionine synthetase	9985	+2	emb CAA95856.1	<i>Catharanthus roseus</i>	7.9/74.5	6.53/46	0	FVIGGPHGDAGLTGR
26	Gibberellin-7-oxidase	18234	+2	gb AAB64346.1	<i>Cucurbita maxima</i>	6.2/50.3	5.38/38	8e-71	EGHEDFLTVAPGR
66	Carboxylesterase	13933	+1	gb ABB89016.1	<i>Actinidia deliciosa</i>	5.4/32.2	5.07/39	1e-105	ELEAVIISPDYR
23	Actin	16782	+2	emb CAA39278.1	<i>Solanum tuberosum</i>	5.9/60	5.44/44	0	VAPEEHPVLLTEAPLNPK SYELPDGGQVITIGSER
61	Actin	1389	+1	emb CAA39278.1	<i>Solanum tuberosum</i>	5.9/60	5.53/43	0	AGFAGDDAPR VAPEEHPVLLTEAPLNPK SYELPDGGQVITIGAER IWHHTFYNELR
PROTEIN PROCESSING									
7	Luminal binding protein (Bip)	9848	+3	dbj BAA12348.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.2/97.8	5.17/74	0	HQIDEIVLVGGSTR
9	Luminal binding protein (Bip)	9848	+3	dbj BAA12348.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.2/97.8	5.27/70	0	ITPSWWAFTDSE HQIDEIVLVGGSTR IKDAVVTVPAYFNDAQR
11	Heat shock Protein 70-3	3071	+3	gb AAR17080.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	7.5/88.7	5.2/66	0	DAGVISGLNVMR EQVFSTYSNDQPGVLIQVYEGE NAVVTVPAYFNDSQR NQVAMNPTNTVFDAGR STVHDWLVLVGGSTR TTPSWAFTDTER

Tabela 2. Continuação

Spot	Putative Identification	Contig	Frame	no. Acesso	Espécie	Teórico pI/Mass (kDa)	Exp. pI/Mass (kDa)	e-value	Peptide(s) matched
42	Heat shock cognate protein 70	13723	+1	gb AAN86275.1	<i>Cucurbita maxima</i>	5.2/82.2	5.17/69	0	NALENYAYNMR
47	Luminal binding protein (Bip)	9848	+3	dbj BAA12348.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.2/97.8	5.2/75	0	HQIDEIVLVGGSTR DAVVTVPAYFNDAQR DAGIAGLNVAR
49	Heat shock protein 68	17714	+1	gb AAC60559.2	<i>Solanum tuberosum</i>	8.9/46.4	5.45/66	1e-145	TTPSWAFNQK RFDDLQVQK AVITVPAYFNDAQR RFDDLQVQK
50	Chaperonin 60 beta subunit	9864	+1	gb AAB39827.1	<i>Cucurbita maxima</i>	9.3/109.2	5.35/59	0	GYISPYFVTDSEK SQYLLDIALTGGTVIR AAVEEGIWGGGCALLR
35	Chaperonin 21	13477	+2	gb AAT80888.1	<i>Vitis vinifera</i>	9.3/32.5	5.43/28	1e-107	ERPSIGTVIAGPGPLDEEGNRK ALSVSPGNTVLYSK SVGGILLPTSAQTKPQGGEVAVGEGR
2	Cell division cycle protein 48	1092	+1	ref XP_636910.1	<i>Dictyostelium</i> sp.	6.4/79.8	5.33/101	0	KYQAFATLQQSR
12	Rof 1	10898	+2	gb AAB82061.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8.7/62.8	5.29/67	1e-162	VLLTVKPQYGFGEK
51	Protein Disulfide isomerase	3564	+1	emb CAA77575.1	<i>Medicago sativa</i>	8.3/76.3	4.85/56	0	IDATANDIPQGTFEVK FGGSWQDYKQPR
64	Disulfide-isomerase precursor-like protein	11236	+1	gb ABB02620.1	<i>Solanum tuberosum</i>	7.2/57.7	5.5/42	1e-160	YGVSGYPTLK SIYTQLEDEAQK SAEALAEFVNSEGGTNVK DLDDFVTFINER

Tabela 2. Continuação

Spot	Putative Identification	Contig	Frame	no. Acesso	Espécie	Teórico pI/Mass (kDa)	Exp. pI/Mass (kDa)	e-value	Peptide(s) matched
39	Mitochondrial processing peptidase	* CA00-XX-LV5012	+2	gb AAK51086.1	<i>Avicennia marina</i>	4.9/30.9	6.49/55	1e-111	DYISTHYSAPR APGGAPANVAIAVAR
18	Peptidase Domain	17453	+1	gb ABE89211.1	<i>Medicago truncatula</i>	6.2/64.9	6.23/48	1e-175	VPPTADHLSLER AFASFDER MNVGVLDDEGLASPDDEFYR VGKPEIFPASTDAR LYDNSAMENLLK
63	Putative C2 domain-containing protein	6667	+3	ref XP_483800.1	<i>Oryza sativa</i>	7.7/41.9	5.07/41	7e-42	LIDVVDEAGLGR AAEDTKPLIGSAR APDPYAPPYGVQPQGSR LRSDYEFGHVLDK
53	Latex-abundant protein	1243	+1	gb AAD13216.1	<i>Hevea brasiliensis</i>	5.3/30.9	5.31/55	9e-82	NEDEGGFGFR
DEFENSE AND OXIDATIVE STRESS									
80	Dehydrin DH1α	11466	+3	gb ABC55670.1	<i>Coffea canephora</i>	9.1/35.4	5.5/24	7e-37	SQYDEYGNPVR QTDEYGNPAR LITFGGSHYK
69	DRT102 (DNA-Damage-repair/Toleration 2)	3643	+3	ref NP_566241.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.8/39.3	5.31/36	4e-97	YDLVAGDYLTTPAGDVHR
13	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	15791	+1	gb AAL99612.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8.7/78.4	6.0/56	0	TGEVIAHVAEGDAEDVNR
14	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2	7046	+2	dbj BAB62757.1	<i>Hordeum vulgare</i>	6.2/70	6.5/54	0	KAFDEGPWPK SGVDSNATLECGGER TGEVIAHVAEGDTEDINR
59	Monodehydroascorbato reductase	16515	+3	sp Q409777	<i>Cucumis sativus</i>	8.9/51.8	3.10/45	0	GTVAVGFDAHDNGEVK

Tabela 2. Continuação

Spot	Putative Identification	Contig	Frame	no. Acesso	Espécie	Teórico pI/Mass (kDa)	Exp. pI/Mass (kDa)	e-value	Peptide(s) matched
25	Aldo/Keto reductase AKR	7584	+1	gb AAX84672.1	<i>Manihot esculenta</i>	8.9/51.6	6.36/39	1e-159	DIEEIIPTCR FAFTYEGGQFGIR FOAENLEHNKLYEQVNAISR
67	Aldo/keto reductase	5265	+2	gb AAX84672.1	<i>Manihot esculenta</i>	8.3/55.9	6.77/39	1e-156	ELGIGIVAYSPLGR LGLDCIDLYYQHR DVEEIIPTCR LIHYAISR FAFTYEGGQFGIR IDTNVPIEATVGLKK
79	Aldo/keto reductase	7584	+1	gb AAX84672.1	<i>Manihot esculenta</i>	8.9/51.6	6.18/39	1e-159	DIEEIIPTCR ELGIGIVAYSPLGR FAFTYEGGQFGIR LSAEEMAELESIAIKGER
0	Major allergen Mal d 1.04	4132	+1	gb AAX18294.1	<i>Malus domestica</i>	8.3/27.4	6.47/19	1e-49	SVEILEGDDGGVGTIK
75	Major allergen Mal d 1.0501	9203	+3	gb AAX18296.1	<i>Malus domestica</i>	5.7/28.3	5.6/19	3e-45	SVEIVEGDDGGVGSIK
76	Major allergen Mal d 1.1.0501	* CA00-XX-LP1015	+3	gb AAX18296.1	<i>Malus domestica</i>	7.2/28.4	6.31/20	4e-45	SVEIVEGDDGGVGSIK AFFLDDHLITK
77	Major allergen protein homolog	* CA00-XX-CA1044	+1	gb AAB97141.1	<i>Prunus armeniaca</i>	9.2/30.2	6.67/19	2e-33	LTTFVEGGELK SVEILEGDDGGVGTIK
78	Major allergen Mal d 1.1.0501	* CA00-XX-LP1015	+3	gb AAX18296.1	<i>Malus domestica</i>	7.2/28.4	6.32/19	4e-45	SVEIVEGDDGGVGSIK AFFLDDHLITK
38	Pathogenesis-related protein PR10	* CA00-XX-FR4083	+1	emb CAD33532.1	<i>Datisca glomerata</i>	8.1/31.7	5.13/19	9e-39	SMDIIEGDDGGAGSIK
32	Chitinase 3-like protein precursor	8971	+1	gb AAL01886.1	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	8.7/47.1	5.21/30	2e-90	VHLSAAPQCSYDPDYLDAAIR LFLGLPASPEAAPSGGFIPHR

Tabela 2. Continuação

Spot	Putative Identification	Contig	Frame	no. Acesso	Espécie	Teórico pI/Mass (kDa)	Exp. pI/Mass (kDa)	e-value	Peptide(s) matched
NO DEFINITE FUNCTION									
3	Unnamed Protein product	9052	+3	dbj BAC39028.1?	<i>Mus musculus</i>	5.0/86.4	5.3/100	0	ETWVEVPNVSWDDIGGLENVKR
8	Unknown protein	679	+1	ref NP_178443.1?	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.2/97.8	5.2/170	3e-07	AGNYLHEYETSHSTKPK KHDNAEVAGAAADLLDAAQNYGK
10	Unknown protein	16402	+3	gb AAU95460.1?	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.8/78.6	6.75/68	0	ALLQQPDFVR QVLNDFQDNPR
17	Os09g0375000	4071	+3	dbj BAF24948.1	<i>Oryza sativa</i>	6.4/65.5	5.46/51	0	YGQDAQNVGDEGGFAPNVQDNR
28	OSJNB0088C09.11	9174	+1	emb CAE05952.3	<i>Oryza sativa</i>	5.9/37.6	5.5/38	3e-89	YSGDTTGGGYNEYSSGGDAGYGNK YSSDTTGGGYNQYSSDTTDTGYNK NLEHLGEAGALAGAYALYEK
29	Hypothetical protein	5277	+2	emb CAB09799.1?	<i>Citrus x paradisi</i>	6.5/44.8	5.4/36	1e-143	SGEVNVVVTQELGGK
54	Unnamed protein product	3904	+3	dbj BAB08888.1?	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.3/53.4	4.81/50	2e-45	SGYEPTSEYSGGYAR
57	Unknown protein	4071	+1	ref NP_567663.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.7/57.9	4.96/49	0	AI SLNPTSAIMYATR
62	Unknown protein	679	+1	ref NP_178443.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.2/63.1	4.42/42	3e-07	LAEGYLSKPSDSEGSTDGGDLLK KHDNAEVAGAAADLLDAAQNYGK TSGVGSYVDKAGNYLHEYETSHSTKPK AGNYLHEYETSHSTKPK EGESAEGEGEGSGGIGQYAK
70	Unknown protein	8979	+1	gb AAM65580.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8.4/46.6	4.9/34	1e-60	SEAAPQPDNGVADLEFRR

(a) identificação putative através do MASCOT MS/MS Ion search; (b) número de acesso do contig no banco de EST de café (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST/>); (c) tradução correta do contig; (d) número de acesso no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); (e) ponto isoeletrico e massa teórica determinada no Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>); (f) ponto isoeletrico e massa experimental determinada pelo Image master 2D Platinum; (g) e-value da protein com maior identidade com o contig; * homologia com *rad* do banco de EST de café

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A análise do proteoma diferencial em raízes revelou mecanismos de tolerância e aclimação ao déficit hídrico através da identificação de proteínas envolvidas metabolismo de carboidratos, desenvolvimento e crescimento, processamento protéico, defesa e estresse oxidativo. A expressão diferencial de enzimas chaves da via glicolítica e ciclo de Krebs denotam mecanismos de aclimação relacionados ao aumento do *pool* de hexoses na raiz, deslocamento de intermediários destas vias para outras rotas biossintéticas como biossíntese de lipídeos e via das pentoses fosfatadas. Os resultados indicam um aumento do intermediário piruvato contribuindo para a produção de aminoácidos envolvidos no controle da homeostase celular, e ainda no aumento da atividade da oxidase alternativa. O aumento de enzimas como aldeído desidrogenase mitocondrial, monodeidroascorbato redutase e aldo/ceto redutases estariam contribuindo para detoxificação e prevenção de peroxidação lipídica frente às espécies reativas de oxigênio geradas em condições de déficit hídrico. A abundância diferencial de actinas e diminuição na abundância de enzimas envolvidas na biossíntese de precursores de etileno e giberelinas denota eventos relacionados com a mudança na arquitetura de raiz. A redução na abundância de chaperones moleculares pode ser uma causa da diminuição da expressão de fatores transcricionais ativados pela via sinalização de proteínas mal-dobradas (UPR) em estresses severos, onde já estaria ocorrendo eventos de morte celular programada, seguida de uma redução na expressão de proteínas relacionadas à proteção celular. Os resultados observados através da análise de pontos isoeletrônicos, peso molecular e análise das sequências de proteínas sugerem a presença de modificações pós-traducionais, ocorrência de variações alélicas de uma mesma proteína, variações isoenzimáticas, eventos de *splicing* alternativo e processamento protéico, e ainda a identificação de proteínas através de homologia com bancos de EST de café contribuiu para uma melhor anotação da biblioteca de café. Apesar destes clones já estarem bem caracterizados fisiologicamente, pouco se sabe sobre quais são os mecanismos moleculares que estariam controlando as respostas frente às condições de déficit hídrico, principalmente relacionado à sinalização entre o sistema radicular e a parte aérea. Esses resultados abrem portas para vários estudos relacionados não só no entendimento na relação entre raiz e parte aérea, como também a cerca de comportamentos de aclimação e tolerância à seca exibidos em café. A proteômica diferencial se destacou como uma ferramenta muito importante

possibilitando traçar uma visão geral do quadro a ser estudado. Desta forma, o proteoma diferencial de raízes possibilitou traçar uma visão geral acerca dos possíveis mecanismos envolvidos e lançando novas perspectivas de estudos futuros em mecanismos pontuais, rotas metabólicas específicas, ensaios de atividade dessas proteínas com abundância diferencial importantes para consolidação dos resultados obtidos nesta tese.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allagulova CR, Gimalov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA** The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry – Moscow*, 68: 945-951, 2003
- Annicchiarico P** Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favourable or drought-stress environments and to contrasting soil types. *Field Crops Research*, 102(1): 51-59, 2007
- Alvarez S, Marsh EL, Schroeder SG, Schachtman DP** Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, Cell and Environment*, 31: 325-340, 2008
- Atkinson CJ, Else MA, Taylor L, Dover CJ** Root and stem hydraulic conductivity as determinants of growth potential in grafted trees of apple (*Malus pumila* Mill.). *Journal of Experimental Botany*, 54(385):1221-1229, 2003
- Aviezer-Hagai K, Skovorodnikova J, Galigniana M, Farchi-Psanty O, Maayan E, Bocovza S, Efrat Y, Von Koskull-Doring P, Ohad N, Breiman A** Arabidopsis immunophilins ROF1 (*AtFKBP62*) and ROF2 (*AtFKBP65*) exhibits tissue specificity, are heat-stress induced, and bind HSP90. *Plant Molecular Biology*, 63(2): 237-255, 2007
- Bae MS, Cho EJ, Choi E, Park OK** Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *The Plant Journal*, 36(5): 652-663, 2003
- Banco de ESTs café EMBRAPA CENARGEN–** UnigeneCafEST – disponível em: <https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>
- Basilion JP, Rouault TA, Massinople CM, Klausner RD, Brugess WH** The iron-responsive element-binding protein: localization of the RNA-binding site to the aconitase active-site cleft. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 91:574-578, 1994
- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T** Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 97(10): 5322-5327, 2000
- Bogeat-Triboulot M, Brosché M, Renaut J, Jouve L, Thiec DL, Fayyaz P, Vinocur B, Witters E, Laukens K, Teichmann T, Altman A, Hausman J, Polle A, Kangasjärvi J, Dreye E** Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in

- Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology*, 143: 876-892, 2007
- Bohren KM, Bullock B, Wermuth B, Gabbay KH** The aldo-keto reductase superfamily: cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldoses reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 9547-9551, 1989
- Boyer PD** The ATP synthase: A splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, 66: 717-749, 1997.
- Bonneau L, Ge Y, Drury GE, Gallois P** What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany*, 59: 491-499, 2008
- Bradford MM** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 284-254, 1976
- Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thoms S, Jentsch S** Role of the ubiquitin-selective CDC48 (UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and others substrates. *EMBO Journal*, 21: 615-621, 2002
- Bryla DR, Bouma TJ, Eissenstat DM** Root respiration in citrus acclimates to temperature and slows during drought. *Plant, Cell and Environment*, 20: 1411–1420, 1997
- Bryla DR, Bouma TJ, Hartmond U, Eissenstat DM** Influence of temperature and soil drying on respiration of individual roots in citrus: integrating greenhouse observations into a predictive model for the field. *Plant, Cell and Environment*, 24: 781–790, 2001
- Carlsson L & Lazarides E** ADP-ribosylation of the Mr 83.000 stress inducible and glucose-regulated protein in avian and mammalian cells: modulation by heat shock and glucose starvation. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 80: 4664-4668, 1983
- Cascardo JCM, Buzeli RAA, Almeida RS, Otoni WC, Fontes EPB** Differential expression of soybean BiP gene family. *Plant Science*, 160:273-281, 2001
- Castle WS** Rootstock as a fruit quality factor in citrus and deciduous tree crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 23: 383 - 394, 1995
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C** How plants cope with water stress in the field. *Annals of Botany*, 89:907-916, 2002

- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E** A hydraulic signal in root-to-shoot signaling of water shortage. *The Plant Journal*, 52: 167-174, 2007
- Close TJ** Dehydrins: a commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Plant Physiology*, 100: 291-296, 1997
- Costa MDL**. Estresse osmótico e do retículo endoplasmático induzem morte celular programada de maneira dependente das proteínas NRPs. Viçosa: UFV, 2007. 123pp. (Tese de Mestrado).
- Cuartero J, Bolari MC, Asins MJ, Moreno V** Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57(5): 1045–1058, 2006
- DaMatta FM, Silveira JSM, Ducatti C, Loureiro ME** Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. Em: Resumo expandido, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Embrapa Café, Brasília, 907-910, 2000
- DaMatta FM, Maestri M, Barros RS** Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica*, 34: 257-264, 1997
- DaMatta FM, Maestri M, Barros RS, Regazzi AJ** Water relations of coffee leaves (*Coffea Arabica* and *Coffea canephora*) in response to drought. *Journal of Horticultural Science*, 68: 741-746, 1993
- Davies WJ & Zhang JH** Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 55–76, 1991
- Dergisi GÜFB** The effects of drought on plants and tolerance mechanisms (Review). *Journal of Science*, 18(4): 723-740, 2005
- Dodd IC** Root-to-shoot signaling: Assessing the roles of ‘up’ in the up and down world of long-distance signaling in planta. *Plant and Soil*, 274: 251-270, 2005
- Dugardeyn J, Vandenbussche F, Van Der Straeten D** To grow or not to grow: What can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by *in silico* gene expression analysis? *Journal of Experimental Botany*, 59(1): 1-16, 2008
- Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, Inanaga S, Tanaka K** Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhance tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta*, 225: 1255-1264, 2007
- Frisse A, Pimenta MJ, Lange T** Expression studies of gibberellin oxidases in developing pumpkin seeds. *Plant Physiology*, 131: 1220-1227, 2003

- Fisher G & Schmid FX** The mechanism of protein folding: implications on in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*, 29(9): 2205-2212, 1990
- Farquharson KL** A Protein Disulfide Isomerase Plays a Role in Programmed Cell Death. *The Plant Cell*, 20, 2008
- Minami A & Fukuda H** Transient and specific expression of a cysteine endopeptidase associated with autolysis during differentiation of *Zinnia mesophyll* cells into tracheary elements. *Plant Cell Physiology*, 108: 489–493, 1995
- Gaudet DA, Laroche A, Frick M, Davoren J, Puchalski B, Ergon A** Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening on winter wheat. *Physiology Molecular Plant Pathology*, 57: 15-24, 2000
- Garavelli JS, Hou Z, Pattabiraman N, Stephens RM** The resid data of protein structure modifications and the NRL-3D sequence-structure database. *Nucleic Acids Research*, 29: 199-201, 2001.
- Gene ontology** - AMIGO [<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo>]
- Gershater MC & Edwards R** Regulating biological activity in plants with carboxylesterases. *Plant Science*, 173: 579-588, 2007
- Glaser E & Dessi P** Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc₁ complex in plants. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(3), 1999. *Archive Biochemistry Biophysics*, 268: 409-425, 1989
- Gollan T, Llan T, Schurr U, Schulze ED** Stomatal responses to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*: The concentration of cations, anions, amino acids in and pH of the xylem sap. *Plant, Cell and Environment*, 15: 551-559, 1992
- Gomes RA, Miranda HV, Silva MS, Graca G, Coelho AV, Ferreira AE, Cordeiro C, Freire AP** Yeast protein glycation *in vivo* by methylglyoxal: Molecular modification of glycolytic enzymes and heat shock proteins. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 273: 5273–5287, 2006
- Goodger JQD, Sharp RE, Marsh EL, Schachtman DP** Relationships between xylem sap constituents and leaf conductance of well-watered and water-stressed maize across tree xylem sap sampling techniques. *Journal of Experimental Botany*, 56 (419): 2389-2400, 2005
- Goodwinm TW & Mercer E** Introduction to plant biochemistry, 2 ed. Pergamon Press, Oxford, UK, 2003

Gramene [<http://pathway.gramene.org>]

Guimarães BLS Caracterização molecular da resposta adaptativa de clones de *Coffea canephora* em condições de déficit hídrico e otimização de metodologia para identificação de proteínas de folhas e raiz de café. Viçosa, UFV, 2007. 61pp.(tese de mestrado)

Hayashi M, DeBellis L, Alpi A, Nishimura M Cytosolic aconitase participates in glyoxylate cycle in etiolated pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiology*, 36:669-680, 1995

Hansen H & Dorffling K Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1599-1605, 1999

Hartl FU & Neupert W Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science*, 247:930-938, 1990

Hendershot LM, Ting J, Lee A Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000 dalton glucose-regulated protein and the role of post-translational modification in its binding function. *Journal Molecular Cell Biology*, 8: 4250-4256, 1988

Hideg É, Nagy T, Oberschall A, Dudits D, Vass I Detoxification function of aldose/aldehyde reductase during drought and ultraviolet-B (280-230nm) stresses. *Plant Cell and Environment*, 26: 513-522, 2003

Hitchcock AL, Krebber H, Frietze S, Lin A, Latterich M, Silver PA The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Molecular Biology Cell*, 12: 3226-3241, 2001

Hoppe T, Matuschewski K, Rape M, Schlenker S, Ulrich HD, Jentsch S Activation on membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome - dependent processing. *Cell*, 102: 577-586, 2000

Horváth I, Multhoff G, Sonnleitner A, Vigh L Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(7): 1653-1664, 2008

Huang DJ, Chen HJ, Lin YH Isolation and expression of protein disulfide isomerase cDNA from sweet potato (*Ipomea batatas* [L.] Lam ‘tainong 57’) storage roots. *Plant Science*, 169: 776-784, 2005

Hedstrom L Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Society Reviews*, 2002;102:4501-4523.

- Image Master 2D platinum software** (Amersham Biosciences) – Melanie version 6.0
- InterPRO** [<http://www.ebi.ac.uk>]
- Irsigler AST, Costa MDL, Zhang P, Reis PAB, Dewey RE, Boston RS, Fontes EPB**
Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genomics*, 8:431-446, 2007
- Jentsch S & Rumpf S** Cdc48 (p97): ‘a molecular gearbox’ in ubiquitin pathway? *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 2006
- Jia J, Fu J, Zheng J, Zhou X, Huai J, Wang J, Wang M, Zhang Y, Chen X**
Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNA from stress-induced maize (*Zea mays* L.) seedlings. *The Plant Journal*, 48: 710-727, 2006
- Kano F, Kondo H, Yamamoto A, Kaneko Y, Uchoyama K, Hosokawa N, Nagata K, Murata M** NSF/SNAPs and p97/p47/VCIP135 are sequentially required for cell cycle-dependent reformation of the ER network. *Genes Cells*, 10: 989–999, 2005
- Kawaguchi R, Girke T, Bray EA, Bailey-Serres J** Differential mRNA translation contributes to gene regulation non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 38: 823-839, 2004
- Kawaguchi R, Williams AJ, Bray EA, Bailey-Serres J** Water-deficit-induced translational control in *Nicotiana tabacum*. *Plant, Cell and Environment*, 26: 221-229, 2003
- Ketelaar T, Allwood EG, Hussey P** Actin organization and root development are disrupted by ethanol-induced overexpression of Arabidopsis actin interacting protein 1 (AIP1). *New Phytologist*, 174: 57-62, 2007
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR** Ctrl, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encode a member of the *Raf* family of protein kinases. *Cell*, 72: 427-441, 1993
- Koag MC, Fenton RD, Wilken S, Close TJ** The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology*, 131: 309-316, 2003
- Kowalczyk S, Jakubowaka A, Zielinska E, Bandurski RS** Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-myoinositol in immature endosperm of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, 119: 165-174, 2003
- Kramer PJ & Boyer JS** Water relations of plants and soils. San Diego: Academic Press, 1995

- Krishna RG, Wold F** Post-translational modification of proteins. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 67: 265-298, 1993
- Krueger NJ** Carbohydrate synthesis and degradation. In: Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB. Editors. *Plant Metabolism*, Longman, Essex, 83-104, 1997
- Kwon YR, Kim SH, Jung MS, Kim MS, Oh JE, Ju HW, Kim KI, Vierling E, Lee H, Hong SW** *Arabidopsis hot2* encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses. *Plant Journal*, 49: 184-193, 2007
- Laemmli UK** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970
- Lange T, Kappler J, Fischer A, Frisse A, Padeffke T, Schmidtke S, Lange MJP** Gibberellin biosynthesis in developing pumpkin seedlings. *Plant Physiology*, 139: 213-223, 2005
- Lange T** Molecular biology of gibberellins synthesis. *Planta*, 204: 409-419, 1998
- Lee B, Jung W, Lee B, Avice J, Ourry A, Kim T** Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. *Physiologia Plantarum*, 132 : 329-337, 2008
- Lee H, Ohta M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK** LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO Journal*, 21: 2692-2701, 2002
- LeNoble ME, Spollen WG, Sharp RE** Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany*, 55: 237-245, 2004
- Li C, Berninger F, Kostela J, Sonninen E** Drought responses of *Eucalyptus microtheca* provenances depend on seasonality of rainfall in their place of origin. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27(3): 231-238, 2000
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME** Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 239–247, 2002
- Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, LaVail MM, Walter P** IRE1 signaling affects cell fate during the unfold protein response. *Science*, 318: 944-949, 2007

- Liu F, Jesen CR, Andersen MN** Hydraulic and chemical signals in the control of leaf expansion and stomatal conductance in soybean exposed to drought stress. *Functional Plant Biology*, 30:65-73, 2002
- Liu J, Srivastava R, Che P, Howell SH** Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmatic reticulum stress signaling. *The Plant Journal*, 51: 897-909, 2007
- Lockard RG, Schneider GW** Stock and scion growth relationships and the dwarfing mechanism in apple. *Horticultural Reviews*, 2:315 – 375, 1981
- Lunde C, Baumann U, Shirley NJ, Drew DP, Geoffrey BF** Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (MdhAR) genes in *Physcomitrella patens*: Implications for the evolution of the MDHAR family in plants. *Plant Molecular Biology*, 60: 259-275, 2006
- Marshall SDG, Putterill JJ, Plummer KM, Newcomb RD** The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Journal Molecular Evolution*, 57: 487-500, 2003
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L** The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 96:8271-8276, 1999
- McLean BG, Eubanks S, Meagher RB** Tissue-specific expression of divergent actins in soybean root. *The Plant Cell*, 2: 335-344, 1990
- Moeder W, Del Pozo O, Navarre DA, Martin GB, Klessig DF** Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, 63(2): 273-287, 2007
- Moiseyev GP, Fedoreyeva LI, Zhuravlev YN, Yasnetskaya E, Jekel PA, Beintema JJ** Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses: new members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related proteins. *Febs Letters*, 407: 207-210, 1997
- Monneveux P, Belhassen E** The diversity of drought adaptation in the wide. *Plant Growth Regulatory*, 20: 85-92, 1996
- Mooney BP, Miernyk JA, Randall DD** Cloning and characterization of the dihydrolipoamide S-acetyltransferase subunit of the plastid pyruvate dehydrogenase complex (E2) from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 120: 443-451, 1999
- Morita H, Mizuuchi Y, Abe T, Kohno T, Noguchi H, Abe I** Cloning and functional analysis of a novel Aldo-keto reductase from *Aloe arborescens*. *Biological Pharmacology Bulletin*, 30(12): 2262-2267, 2007

- Mundree SG, Whittaker A, Thomson JÁ, Farrant JM** An aldose reductase homolog from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. *Planta*, 211: 693-700, 2000
- Navarre DA, Wendehenne D, Durner J, Noad R, Klessing DF** Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiology*, 122: 573-582, 2000
- NCBI - National Center for Biotechnology Information** - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Neumann PM** Evidence for long-distance xylem transport of signal peptide activity from tomato roots. *Journal of Experimental Botany*, 58 (8): 2217-2223, 2007
- Oberschall A, Déak M, Torök K, Sass L, Vass I, Kovács I, Fehér A, Dudits D, Horváth GV** A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant Journal*, 24: 437-446, 2000.
- Onda Y, Kato Y, Abe Y, Ito T, Ito-Inaba Y, Morohashi M, Ito Y, Ichikawa M, Matsukawa K, Otsuka M** Pyruvate-sensitive AOX exists as a non-covalently associated dimer in the homeothermic spadix of the skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. *Federation of Biochemical Societies Letters*, 581(30): 5852 -5858, 2007
- Padilha FM & Pugnaire FI** Rooting depth and soil moisture control mediterranean woody seedling survival during drought. *Functional Ecology*, 21: 489-495, 2007
- Pallavan-Unsal N, Buyuktuncer E, Tufekci MA** Programed cell death in plants. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4: 9-23, 2003
- Patel MS & Korotchkina LG** Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Society Transactions*, 34(2): 217-222, 2006
- Patonnier MP, Peltier J, Marigo G** Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. *Journal of Experimental Botany*, 50(336): 1223-1229, 1999
- Pandey A & Mann M** Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405: 837-845, 2000
- Patterson SD & Aebersold RH** Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics*, 33: 311-323, 2003
- Pego JV & Smeekens SCM** Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends Plant Science*, 5: 531-536, 2000
- Pierik R, Tholen D, Pooter H, Visser EJW, Voosenek LACJ** The janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, 11(4): 173-186, 2006

- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Ducatti C** Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany*, 96: 101-108, 2005
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME** Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, 167: 1307–1314, 2004
- Pereira JS, Chaves MM** Plant water deficits in mediterranean ecosystem, 1993 . In: Smith JAC, Griffiths H. Plants responses to water deficits-form cell to community. Oxford: BIOS scientific Publishers Ltd., 5: 237-251, 2004
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N** Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology Biochemistry*, 40: 537:548, 2002
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT** Effects of long-term drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *Kouillon*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 56:263-273, 2006
- Protein Prospector software**, <http://prospector.ucsf.edu/cgi-bin/>
- Raasi R & Wolf DH** Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18 : 780-791, 2007
- Rabinovich E, Kerem A, Frohlich KU, Diamant N, Bar-Nun S** AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmatic reticulum-associated protein degradation. *Molecular Cell Biology*, 22 : 626-634, 2002
- Ramos LCS & Carvalho A** Shoot and root evaluations on seedlings from *Coffea* Genotypes. *Bragantia*, 56(1), 1997
- Ramos RLS, Lima MMA** Avaliação da superfície relativa do sistema radicular de cafeeiros. *Bragantia*, 39: 1-5, 1980
- Reape TJ & McCabe PF** Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist*, 180: 13-26, 2008
- Rozovsky S & McDermott AE** Substrate product equilibrium on a reversible enzyme, triosephosphate isomerase. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 104: 2080-2085, 2007.
- Rorat T** Plant dehydrins – Tissue location, structure and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 11 : 536-556, 2006

- Rachmilevitch S, Lambers H, Huang B** Root respiratory characteristics associated with plant adaptation to high soil temperature for geothermal and turf-type *Agrostis* species. *Journal of Experimental Botany*, 57(3): 623-631, 2006
- Sato Y & Yokoya S** Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Reports*, 27 :329-334, 2008
- Sauter A, Dietz KJ, Hartung W** A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signaling. *Plant, Cell and Environment*, 25: 223-228, 2002
- Schachtman DP & Goodger JQD** Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, 13(6): 281-287, 2008
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HB, Nguyen HT** Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2343-2351, 2004
- Sheffield J, Taylor N, Fauquet C, Chen S** The cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root proteome: protein identification and differential expression. *Proteomics*, 6(5): 1588-1598, 2006
- Schellenbaum L, Muller J, Boller T, Wiemken A, Schuepp H** Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. *New Phytology*, 138, 59-66, 1998
- Schneider G, Jensen E, Spray CR, Phinney BO** Hydrolysis and reconjugation of gibberellins A20 glucosyl ester by seedlings of *Zea mays*. L. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 89:8045-8048, 1992
- Schoröder G, Eichel J, Breinig S, Schröder J** Three differentially expressed S-adenosylmethionine synthetases from *Catharanthus roseus*: molecular and functional characterization. *Plant Molecular Biology*, 33: 211-222, 1997
- Siedow JN, Umbach AL** The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation and regulatory diversity. *Biochemical Biophysics Acta*, 1459:432-439, 2000
- Silva VA** Caracterização fisiológica da tolerância à seca em *Coffea canephora*: contribuição relativa do sistema radicular e da parte aérea. Viçosa, UFV, 2007. 57pp. (Tese de Doutorado)

- Songsri P, Jogloy S, Vorasoot N, Akkasaeng C, Patanothai A, Holbrook CC** Root distribution of drought-resistant peanut genotypes in response to drought. *Journal Agronomy & Crop Science*, 194: 92-103, 2008
- Sorce C, Massai R, Picciarelli P, Lorenzi R** Hormonal relationships in xylem sap of grafted and ungrafted *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulture*. 93, 333–342, 2002
- Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R** Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell*, 98: 159-169, 1999
- Souza CR, Maroco JP, Santos TP, Rodrigues ML, Lopes CM, Pereira JS, Chaves MM** Impact of deficit irrigation on water use efficiency and carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) of field-grown grapevines under Mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2163-2172, 2005
- Su P & Li H** Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology*, 146: 1231-1241, 2008
- Sung DY & Guy CL** Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. Evidences for pleiotropic consequences. *Plant Physiology*, 132:979-987, 2003
- Sung DY, Kaplan F, Guy CL** Plant Hsp70 molecular chaperones: protein structure, gene family, expression and function. *Physiology Plant*, 113: 443-451, 2001
- Sunkar R, Bartels D, Kirch H** Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal*, 35: 452-464, 2003
- Stock D, Leslie AGW, Walker JE** Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286: 1700-1705, 1999
- Takei K, Sakakibara H, Tanigushi M, Sugiyama T** Nitrogen-Dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology*, 42(1): 85-93, 2001
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** *Gibberellin insensitive dwarf1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437: 693-698, 2005

- Thompson AJ, Mulholland BJ, Jackson AC, Mckee JMT, Hilton HW, Symonds RC, Sonneveld T, Burbidge A, Stevenson P, Taylor IB** Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant, Cell and Environment*, 30: 67-78, 2007
- Thompson DD, Wilkinson S, Bacon MA, Davies WJ** Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behaviour during water deficit. *Physiologia Plantarum*, 100:303-313, 1997
- Tomaz MA, Sakiyama NS, DaMatta FM, Martinez HP, Cruz CD, Pereira, AA** Efeito do porta-enxerto nas trocas gasosas, área foliar e superfície de raiz de mudas de *Coffea arabica* L. *Revista Ceres*, 53: 86-91, 2006
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K** Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology*, 17:113-122, 2006
- Van den Boogaard R, De Boer M, Veneklaas EJ, Lambers H** Relative growth rate, biomass allocation pattern and water use efficiency of three wheat cultivars during early ontogeny as dependent on water availability. *Physiologia Plantarum*, 98: 493–504, 1996
- Van der Straeten D, Rodrigues-Pousada RA, Goodman HM, Van Montagu V** Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. *The Plant Cell*, 3: 719-735, 1991
- Van-Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V** Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 12: 245-264, 1994
- Van-Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135-162, 2006
- Vieira LGE, Andrade AC; Colombo CA, Moraes AHA, Methaz A, Oliveira AC, Labate CA, Marino CL, Monteiro-Vitorello CB, Monte DC, Giglioti E, Kimura T, Romano E, Kuramae EE, Lemos EGM, Almeida RP, Jorge EC, Albuquerque EVS, Silva FR, Vinecky F, Sawazaki HE, Dorry HFA, Carrer H, Abreu N, Batista JAN, Teixeira JB; Kitajima P, Xavier KG, Lima LM, Camargo LEA; Pereira LFP, Coutinho LL, Lemos MVF, Romano MR, Machado MA, Costa MMC, Grossi de Sá MF, Goldman HS, Ferro MIT, Tinoco MLP, Oliveira MC, Sluys MV, Shimizu MM, Maluf MP, Eira MTS, Filho OG, Arruda P, Mazzafera P, Mariani PDSC, Oliveira RLBC, Harakava R, Balbao SF, Tsai AM, Mauro SMZ, Santos SN, Siqueira WJ, Costa GGL, Formighieri EF, Carazzolle MF,**

- Pereira GAG** Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18(1):95-108, 2006
- Xiao H & Nassuth A** Stress and development-induced expression of spliced and unspliced transcripts from two highly similar dehydrin 1 genes in *V. riparia* and *V. vinifera*. Plant Cell, 25: 968-977, 2006
- Xu DP, Duan XL, Wang BY, Hong BM, Ho THD, Wu R** Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HAV1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiology, 110: 249-257, 1996
- Walter MH, Liu JW, Wuun J, Hess D** Bean ribonuclease- like pathogenesis-related protein genes (*Ypr10*) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. European Journal Biochemistry, 239: 281-293, 1996
- Wan J, Torres M, Gabapathy A, Thelen J, Dague BB, Mooney B, Xu D, Stacey G** Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 18(5): 458-467, 2005
- Warner SAJ, Scott R, Draper J** Characterization of wound-induced transcript from the monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR) proteins. Plant Molecular Biology, 19: 555-561, 1992
- Weiss D & Ori N** Mechanism of cross talk between gibberellin and others hormones. Plant Physiology, 144: 1240-1246, 2007
- Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N** The protein import machinery of mitochondria. The Journal of Biological Chemistry, 279(15):14473-14476, 2004
- Wilkinson S & Davies WJ** Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. Plant Physiology. 113: 559–573, 1997
- Woodward AW & Bartels B** Auxin regulation, action and interaction. Annals of Botany, 95: 707-735, 2005
- Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C** Human aldehyde dehydrogenase gene family. European Journal Biochemistry, 251: 549-557, 1998
- Yoshimura K, Masuda A, Kuwano M, Yokota A, Akashi K** Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of C₃ xerophyte (wild watermelon) under water deficits. Plant Cell Physiology, 49(2): 226-241, 2008

- Zhang C, Qian J, Bao Z, Hong X, Dong H** The induction of abscisic-acid-mediated drought tolerance is independent of ethylene signaling in Arabidopsis plants responding to harpin protein. *Plant Molecular biology*, 25: 98-114, 2007
- Zhao K, Wang W, Rando OJ, Xue Y, Swiderek K, Kuo A, Crabtree GR** Rapid and phosphoinositol-dependent binding of SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T-lymphocyte receptor signaling. *Cell*, 95: 625-636, 1998

CAPÍTULO II

TROCAS GASOSAS E ACÚMULO DE ALDEÍDO MALÔNICO EM DOIS CLONES DE *Coffea canephora* SOB DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

SOARES, Carla Quinhones Godoy, MSc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2008. **Trocas gasosas e acúmulo de aldeído malônico em dois clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico.** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Fábio Murilo DaMatta.

A resposta primária das plantas a condições de déficit hídrico é o fechamento estomático para minimizar perda de água pela transpiração. Entretanto isto leva a uma limitação no dióxido de carbono disponível para fixação através da fotossíntese, resultando em um decréscimo na eficiência quântica e um excesso de energia nos centros de reação dos fotossistemas que pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio. Neste trabalho foram utilizadas plantas de *Coffea canephora* Pierre Var. *Kouillou*: clone 120, genótipo tolerante ao déficit hídrico e clone 109A, genótipo sensível ao déficit hídrico. As plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) e sob déficit hídrico imposto pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingissem um potencial hídrico na antemã (Ψ_{am}) de $-1,5 \pm 0,20$ MPa, e $-3,0 \pm 0,20$. Também foram avaliados a taxa de assimilação líquida de carbono (*A*), condutância estomática ao vapor de água (*g_s*), taxa transpiratória (*E*), razão interna e externa de carbono (*C_i/C_a*), taxa respiratória, parâmetros de fluorescência da clorofila e aldeído malônico foi utilizado para estimar a peroxidação lipídica. Os resultados mostram que o clone sensível (109A) apresenta mecanismos relacionados a aumento no ciclo das xantofilas como dreno do excesso de energia e aumento da dissipação térmica sob déficits hídricos moderados. Porém, em condições de déficit hídrico severo estes mecanismos não se apresentam mais eficientes neste clone. Já o clone tolerante (120) em condições de déficit hídrico severo, apresentou uma redução do rendimento quântico efetivo do fotossistema II associado à redução nas taxas de transporte de elétrons e no coeficiente de extinção não-fotoquímica, seguido de um aumento em fração de irradiância não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente, não sendo traduzidos em danos oxidativos, sugerindo outros tipos de mecanismos envolvidos no dreno do excesso de energia.

ABSTRACT

SOARES, Carla Quinhones Godoy, MSc., Universidade Federal de Viçosa, june 2008. **Study of tolerant mechanism involved in two *Coffea canephora* clones under hidric stress conditions.** Adviser: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-advisers: Marcelo Ehlers Loureiro e Fábio Murilo DaMatta.

The plant primary response to water deficit is stomata closing to minimize water losses by transpiration. However, this leads to limitation in carbon dioxide availability for photosynthetic fixation resulting in a decrease of quantum efficiency and an excess of energy in the photosynthetic centers generating reactive oxygen species. In this work it was used plants of *Coffea canephora* Pierre Var. *Kouillou*: clone 120, water deficit tolerant genotype, and clone 109A, water deficit sensitive genotype. The plants were evaluated under full irrigation condition (control) and under water deficit imposed by suspension of irrigation until predawn plant water potential (Ψ_{pd}) reached $-1,5 \pm 0,20$ MPa, and $-3,0 \pm 0,20$ MPa. It was also measured net carbon assimilation rate (A), stomata conductance to water vapor (gs), transpiratory rate (E), internal and ambient CO₂ concentration ratio (Ci/Ca), respiratory rate, chlorophyll a fluorescence and malondealdehyde was used as an estimation of lipid peroxidation. The results show that the sensitive clone (109A) presents mechanisms related to increase in xanthophyll cycle as drain of excess energy and increase in heat dissipation under water deficits moderate. However, under conditions of severe drought these mechanisms are no more efficient in this clone. No longer, tolerant clone (120) under severe drought conditions, showed reduction in photosystem II quantum yield associated to a reduction in the rate of electron transport and non-photochemical quenching coefficient, followed by an increase in fraction of absorbed light that was neither used in photochemistry nor dissipated thermally, that was not translated in oxidative damage, suggesting other types of mechanisms involved in the drainage of excess energy.

1. INTRODUÇÃO

Entre os fatores abióticos que limitam a produtividade das plantas, destaca-se a baixa disponibilidade de água no solo. As condições de seca induzem respostas fisiológicas e bioquímicas nas plantas, incluindo fechamento estomático, repressão de crescimento celular, redução da taxa fotossintética, aumento da taxa respiratória, ajustamento osmótico, diminuição na eficiência do uso de água, modulação da partição de assimilados e defesas contra danos oxidativos (Ludlow & Muchow, 1990), respondendo às condições de déficit hídrico em níveis celulares e moleculares (Shinozaki & Yamagusho-Shinozaki, 2007).

Na medida em que a água torna-se limitante, com o fechamento estomático, ocorre uma limitação no dióxido de carbono disponível para fixação da fotossíntese e como resultado um decréscimo na eficiência quântica e um excesso de energia nos centros de reação dos fotossistemas, envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio (superóxido, O_2^- ; oxigênio singlete, *O ; peróxido de hidrogênio, H_2O_2 ; radicais hidroxil, OH^- ; entre outros) que causam peroxidação de lipídeos, danos celulares, inativação de enzimas do ciclo de Calvin, entre outros danos (Tambussi *et al.*, 2000). Sendo assim, sob condições de déficit hídrico, o aparecimento de danos oxidativos é potencializado resultando em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Smirnov, 1995; Asada, 1999).

Após vários anos de pesquisa a cerca da fisiologia de espécies do gênero *Coffea* *sp.*, tem se mostrado que genótipos do grupo Canéfora exibem maior potencial de ajustamento osmótico e de decréscimos no ajustamento elástico (DaMatta *et al.*, 1993), além de apresentarem um sistema radicular mais profundo em relação a cultivares do grupo Arábica (Ramos & Lima, 1980), compensando as perdas transpiratórias via aumento de absorção de água.

A partir de estudos de Ferrão *et al.* (2000), DaMatta *et al.* (2000) selecionaram alguns clones com respostas contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico, dentre eles o clone 120 (tolerante) e 109A (sensível) com objetivo de identificar e compreender mecanismos fisiológicos de tolerância à seca nesta espécie. A maior tolerância à seca do clone tolerante (120) também pode estar associada à maior tolerância ao estresse oxidativo, à habilidade para manutenção de exportação de assimilados, e à capacidade de manutenção do status hídrico adequado, estes combinados com um sistema radicular profundo e um controle estomático eficiente (DaMatta & Ramalho, 2006; Silva, 2007).

Um sistema radicular mais profundo nos clones tolerantes possibilita um melhor acesso a água, mantendo desta forma melhor status hídrico em relação aos clones sensíveis (Pinheiro *et al.*, 2005). A razão entre massa da raiz e área foliar é maior no clone 109A, mas por outro lado a profundidade do sistema radicular é maior no clone tolerante a seca (120), e o potencial hídrico de -3 MPa é alcançado muito mais rapidamente pelo clone sensível, que também apresenta uma maior queda na condutância estomática, e ainda razão isotópica de carbono é menor do que a encontrada em outros clones, sob condições de estresse. Desta forma, as diferenças na profundidade da raiz, controle estomático, e não ajustamentos osmóticos e elásticos, explicam, fundamentalmente, as diferenças na tolerância diferencial ao estresse hídrico nos clones tolerantes comparados com os sensíveis (Pinheiro *et al.*, 2005).

Takahashi *et al.* (2007) em experimentos com *Arabidopsis* concluíram que o consumo de energia fotoquímica, como ATP e NADPH, através da via fotorespiratória ajudam a evitar danos fotooxidativos no fotossistema II. Sob condições de déficit hídrico a fotorespiração pode prover uma fotoproteção agindo como uma via alternativa para o excesso de energia gerado no aparelho fotossintético (Takahashi *et al.*, 2007; Cramer *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2002, 2007). Para proteção da maquinaria fotossintética contra estresses oxidativos, as plantas precisam dissipar o excesso de energia luminosa, o que pode ser alcançado também mediante aumento nos níveis de xantofilas e carotenos ou por atuação do sistema de defesa antioxidativo (Asada, 1999).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar as respostas fisiológicas diferenciais em dois clones de *Coffea canephora* em resposta as condições de déficit hídrico sob imposição rápida de estresse.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 metros de altitude), Minas Gerais. As condições climáticas referentes ao período do experimento foram obtidas na estação meteorológica da Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizadas plantas de *Coffea canephora* Pierre Var. *Kouillou*: clone 120, genótipo tolerante ao déficit hídrico e clone 109A, genótipo sensível ao déficit hídrico. As mudas foram obtidas por processo de estaquia no Instituto Capixaba de Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER. Ao completarem 4 meses, as mudas foram transplantadas para vasos de 12L preenchidos com uma mistura composta por solo, areia e esterco bovino na proporção de 3:1:1 (v/v/v). Ao atingirem 10 meses de idade (janeiro de 2008), as plantas foram transferidas para casa de vegetação com laterais que permitiam livre acesso de ar entre o seu interior e exterior. Estas plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) e sob déficit hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingiram um potencial hídrico às 05:00h da manhã (Ψ_{am}) de $-1,5 \pm 0,20$ MPa, e $-3,0 \pm 0,20$ MPa, valores que caracterizam uma condição de estresse moderado e severo, respectivamente, para plantas de café (Lima *et al.*, 2002).

Todas as avaliações e medições foram realizadas em folhas do terceiro e quarto ramos plagiotrópicos medianos para verificação do nível de potencial hídrico alcançado. As avaliações de parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila foram realizadas sempre na mesma folha, completamente expandida, em cada planta durante todo experimento. O experimento teve início no dia 29 de janeiro de 2008, data em que foi realizada a última irrigação nas plantas tratadas, e foi encerrado no dia 16 de fevereiro de 2008, quando a última planta que atingiu o potencial hídrico severo de $-3,0$ MPa. Ao longo do experimento, amostras foliares e de raiz foram coletadas quando as plantas atingiram Ψ_{am} $-0,05$, $-1,5$ e $-3,0$ MPa, e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido para futuras análises. O experimento foi montado em um esquema em fatorial 2×3 , compostos de 2 clones (sensível (109A) e tolerante (120)), três regimes hídricos (irrigado (Ψ_{am} $-0,05$ MPa), não-irrigado estresse hídrico moderado (Ψ_{am} $-1,5$ MPa) e não-irrigado estresse hídrico severo (Ψ_{am} $-3,0$ MPa) e cinco repetições onde cada parcela era constituída por uma planta. Todas as medições de parâmetros de trocas gasosas e fluorescência foram feitas sempre respeitando o

delineamento em blocos casualizados. Como teste de médias utilizou-se o teste de *Newman-Keuls* ($p \leq 0,05$).

2.2. Potencial hídrico foliar

Foi utilizada uma bomba de pressão do tipo Scholander conforme descrito por DaMatta *et al.* (1997), e as medições realizadas às 05:00h (antemanhã). As determinações foram feitas em folhas individualizadas e completamente expandidas localizadas nos ramos plagiotrópicos medianos das plantas.

2.3. Trocas gasosas

Taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática ao vapor de água (g_s), taxa transpiratória (E), razão interna e externa de carbono (razão C_i/C_a) e taxa respiratória foram determinadas por volta das 08h00 pelo analisador de gases a infravermelho portátil (LICOR 6400, Li-COR, Lincoln, Nebraska, EUA) sob intensidade de fluxo fotônico de $1000 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A taxa respiratória foi determinada segundo Franco & Lüttge (2002), onde a taxa respiratória é medida ao meio dia após 20 minutos de aclimação da folha no escuro. A eficiência do uso da água foi calculada pela razão A/E .

2.4. Variáveis de fluorescência

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram medidos nas mesmas folhas utilizadas para medições de trocas gasosas por meio de um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (PEA, Hansatech, Norfolk, Reino Unido), segundo Schreiber *et al.* (1995).

As medições realizadas na antemanhã determinaram a fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável ($F_v = F_m - F_0$), e eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) (F_v/F_m), parâmetros estes determinados em condições de escuro. A 8:00 h e 12:00h foram determinados as variáveis de fluorescência constante (F_s') e fluorescência máxima (F_m'), parâmetros determinados em condições luminosidade. Folhas adaptadas ao escuro por 30 min foram iluminadas com pulsos de luz vermelha de baixa intensidade e frequência para obtenção da fluorescência inicial (F_0). Um pulso de luz saturante de pulso de $6000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi aplicado por um segundo para medir a emissão de fluorescência máxima (F_m). Com esses parâmetros foi estimado o rendimento quântico efetivo através do FSII por $\Phi_{\text{FSII}} = (F_m' - F_s')/F_m'$, conforme Genty *et al.*, 1989. Foi estimada F_0 adaptada a luz $F_0' = F_0/(F_v/F_m + F_0/F_m')$, de acordo com Oxboroug & Baker (1997). O coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) foi determinada pela equação onde

$NPQ=(F_m/F_m')-1$, segundo Krause & Weiss (1991). A fração de irradiância não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente foi determinada como $P_E = (F_v'/F_m')*(1-q_p)$, segundo Demming-Adams *et al.* (1996). A taxa de transporte de elétrons foi calculada segundo a fórmula $ETR= \Phi_{FSII} \times 0,5 \times FFF \times A_L$, onde A_L é a absorvância luminosa para *Coffea sp.* (Dias, 2006), e FFF é a intensidade de fluxo fotônico $1000 \mu\text{mol de fótons. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, e 0,5 a fração de energia distribuída para o PSII.

2.5. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi quantificada através da determinação de aldeído malônico formado. Três discos foliares de 1,4 cm de diâmetro (160mg) foram macerados em 2 mL de solução de etanol:água 80:20 (v/v), seguido de centrifugação a 3000g por 10 minutos. A quantidade de 500 μL do extrato foi adicionada a 1,5 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) contendo 0,65% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (+TBA), e como controle negativo outros 500 μL do extrato foram adicionados a 1,5 mL da solução de TCA 20% sem ácido tiobarbitúrico (-TBA). As amostras foram misturadas vigorosamente e incubadas a 95°C por 20 minutos, e em seguida a reação foi paralisada no gelo. As amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos. Foram realizadas leituras de absorvância a 400, 532 e 600nm, segundo protocolo de Hodges *et al.* (1999). Onde a concentração de MDA é expresso em nmol. g^{-1} . MS, segundo: $(((A-B/157000)*10^6)*2)*2000*500)/MS$, onde: $A=[((A_{532} +TBA) - (A_{600}+TBA)) - ((A_{532} -TBA) - (A_{600} -TBA))]$; $B=[((A_{440} +TBA) - (A_{600}+TBA)*0,057)]$, e o coeficiente de absorvância para o MDA é de $157 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas, com base no delineamento em blocos casualizados, com seis tratamentos e cinco repetições, formando um esquema fatorial 2 x 3 (compostos de 2 clones, três regimes hídricos) onde a parcela era constituída de uma planta por vaso.

Realizou-se análise de variância (ANOVA) dos dados à significância de 5% de probabilidade. As médias foram agrupadas pelo teste de Newman-Keuls a 5 % de probabilidade pelo programa SAEG (Sistema de análises estatísticas e genéticas – Universidade Federal de Viçosa).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Status hídrico

As plantas de *Coffea canephora*, clones sensível (109A) e tolerante (120) foram mantidas em suspensão da irrigação até atingirem potenciais hídricos na antemanhã (Ψ_{am}) de $-1,5 \pm 0,5$ MPa, considerado estresse hídrico moderado, e $-3,0 \pm 0,5$ MPa, considerado estresse severo para café (Lima *et al.*, 2002). Nas plantas controle (irrigadas) o potencial hídrico foliar foi sempre superior à $-0,05$ MPa. Após suspensão da irrigação, a partir do quarto dia do experimento foi observada uma diferença de estado hídrico entre as plantas controle e tratadas (Figura 1). Nas plantas tratadas (não-irrigadas) do clone sensível (109A) o potencial hídrico diminuiu mais rapidamente que nas plantas não-irrigadas do clone tolerante (120), estando estes resultados de acordo com a literatura (Lima *et al.*, 2002; Praxedes *et al.*, 2006; Guimarães, 2007; Silva, 2007). As plantas do clone sensível (109A) atingiram os potenciais de $-1,5$ e $-3,0$ MPa por volta do oitavo e décimo segundo dias após imposição do déficit hídrico, respectivamente (Figura 1). Ao passo que, nas plantas não-irrigadas do clone tolerante (120) o potencial hídrico apresentou tendência a diminuir muito mais lentamente, alcançando os potenciais de $-1,5$ e $-3,0$ MPa por volta do décimo segundo e décimo sexto dias, respectivamente (Figura 1). Este fato pode estar relacionado a mecanismos de tolerância à seca exibidos pelo clone tolerante (120). Pinheiro *et al.* (2005) observaram que o clone tolerante (120) apresenta um sistema radicular mais profundo que o clone sensível (109A) e, ainda, Silva (2007) mostrou que o clone 120 exibe um fechamento estomático mais pronunciado já nos momentos iniciais de estresse, por volta de potenciais hídricos de $-0,5$ MPa, que está relacionado com os mecanismos de tolerância diferencial exibidos por estes clones sob condições de déficit hídrico.

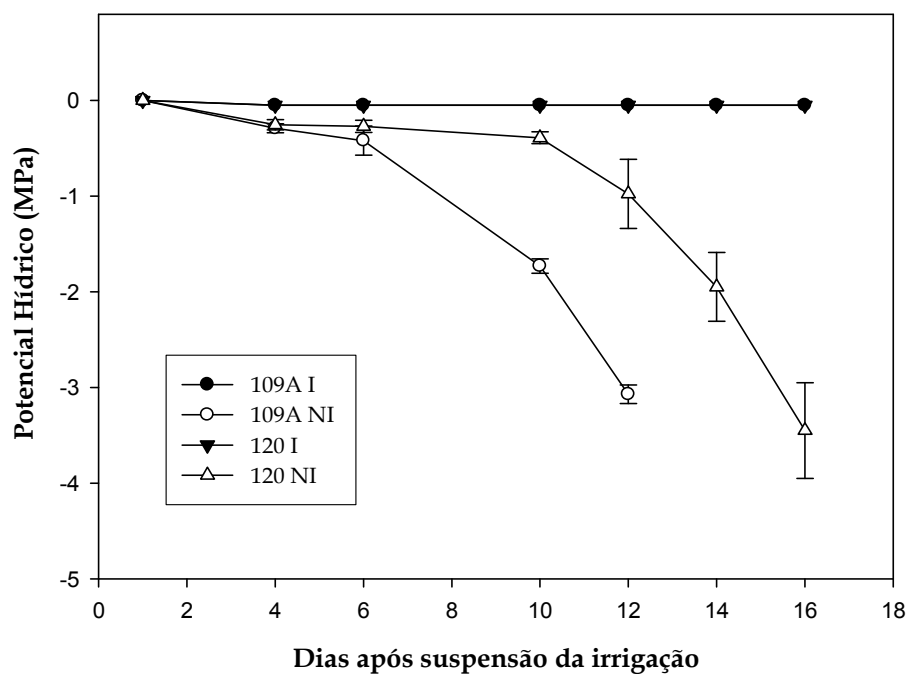


Figura 1. Perfil temporal do potencial hídrico foliar na antemanhã em clones de *Coffea canephora*. Clone sensível ao déficit hídrico (109A), clone tolerante (120) ao déficit hídrico. sob condições irrigadas (símbolos cheios) e sob condições de suspensão da irrigação (símbolos vazios). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas). I = irrigado, NI = não-irrigado (não irrigado após a imposição do déficit hídrico).

3.2 Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência

O cafeeiro é tradicionalmente considerado como uma planta que apresenta valores de fotossíntese líquida (A) muito baixos, que podem variar conforme o tamanho do vaso, geralmente entre 4 a 10 $\mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Lima *et al.*, 2002; DaMatta, 2003; Pinheiro *et al.*, 2004). Os valores de A para as plantas controles foram de 8,3 $\mu\text{mol de CO}_2$ consumido $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e 6,2 $\mu\text{mol de CO}_2$ consumido $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ nos clones sensível (109A) e tolerante (120), respectivamente (Figura 2A). A taxa fotossintética líquida às 08:00h sob condições irrigadas apresentou-se maior no clone sensível (109A) em relação ao clone tolerante (120), e em ambos os clones sempre superior em relação às condições de déficit hídrico (Figura 2A). Valores entre 8 e 10 $\mu\text{mol de CO}_2$ consumido $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ foram obtidos para estes mesmo clones em experimentos em vasos de doze litros realizados por Silva (2007). Esta diferença na taxa fotossintética encontrada entre os dois clones pode estar relacionada a uma menor condutância estomática exibida no clone tolerante (120) em relação ao clone sensível (109A) (Figura 2B). Sabe-se que em condições de déficit hídrico a fotossíntese pode ser direta ou indiretamente afetada por mecanismos estomáticos. Em condições de déficit hídrico, pode-se observar que ocorreu um declínio na fotossíntese líquida tanto no clone tolerante como no sensível. Em condições de déficit hídrico moderado, o clone sensível (109A) apresentou um declínio de 74 %, e o clone tolerante, 51%. Em condições de déficit hídrico severo, o clone sensível (109A) apresentou uma redução na fotossíntese líquida de 82%, semelhante à redução de 83% no clone tolerante (120) (Figura 2A). Estes dados diferem dos dados observados por Silva (2007), em experimentos com os mesmos clones, onde sob déficit hídrico severo, reduções mais pronunciadas na taxa fotossintética foram observadas no clone sensível (109A). Em Silva (2007), o déficit hídrico severo foi alcançado no décimo oitavo dia após suspensão da irrigação no clone sensível (109A), enquanto no clone tolerante, foi alcançado no vigésimo quinto dia. Estas diferenças na taxa fotossintética podem ser devidas a diferenças na taxa de imposição do estresse, visto que o mesmo foi mais lento em estudos feitos por Silva (2007).

A condutância estomática, às 08:00h da manhã, mostrou-se reduzida sob condições de déficit hídrico, e esta redução ocorreu de forma distinta entre os clones. Em potencias hídricos moderados, o clone sensível apresentou uma redução de 87% e o clone tolerante 63%, em relação às condições irrigadas na condutância estomática (Figura 2B).

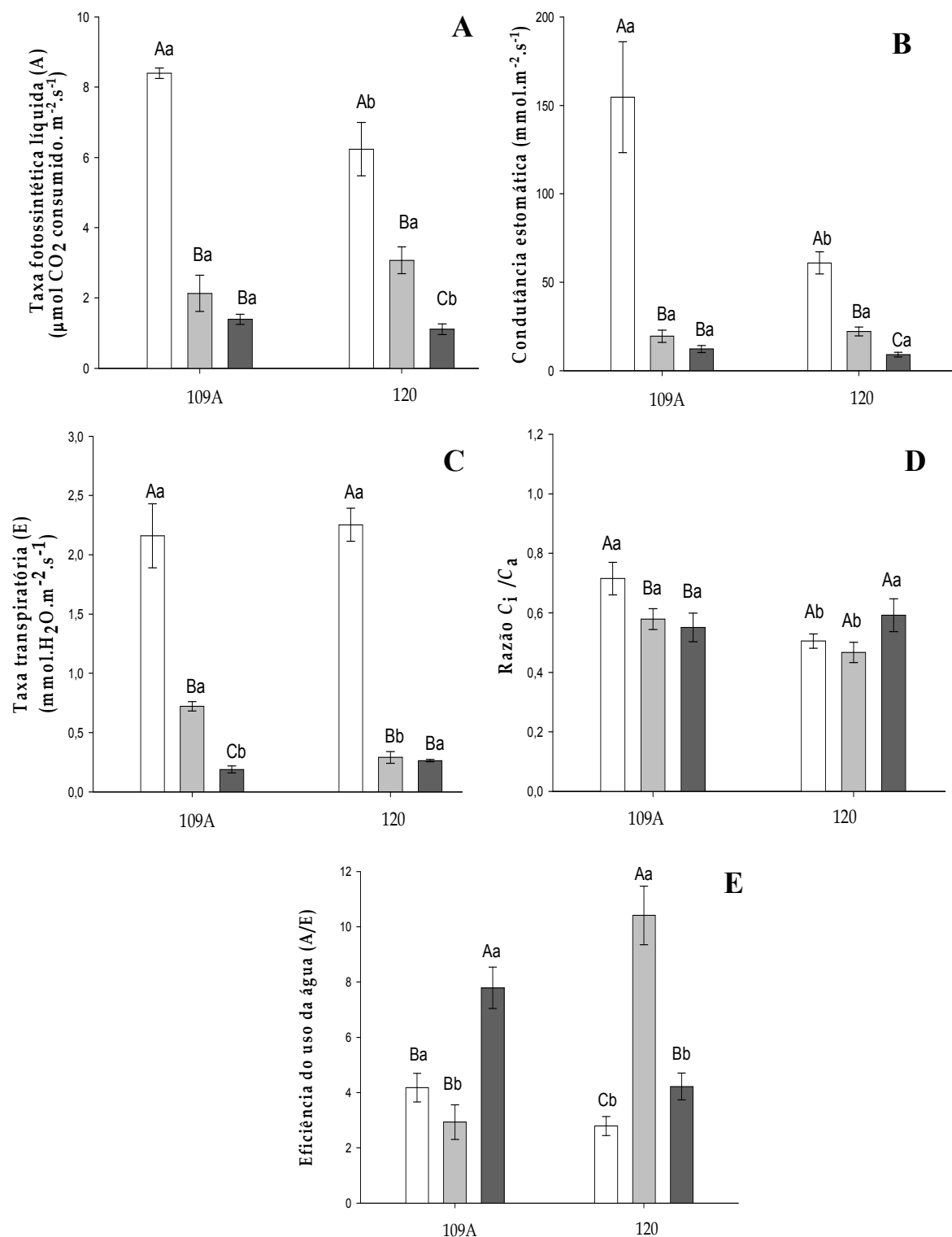


Figura 2. Efeito do déficit hídrico sobre a taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), taxa transpiratória (C), razão C_i/C_a (D) e eficiência do uso da água (E) em clones de *Coffea canephora*. Clone sensível ao déficit hídrico (109A), e clone tolerante ao déficit hídrico (120). Plantas irrigadas (barras brancas), não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico moderado de -1,5 MPa (barras cinzas), e não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico severo de -3,0 MPa (barras pretas). As colunas representam a média e as barras o erro padrão de cinco repetições. As medições foram realizadas em folhas dos ramos plagiotrópicos medianos às 08:00 h. Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre médias de tratamentos diferentes dentro de um mesmo clone e letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em clones diferentes, (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas).

A redução observada na condutância estomática de déficit hídrico moderado para déficit hídrico severo foi de 36% para o clone sensível (109A) e de 59% para o clone tolerante (120) (Figura 2B). Em condições não-irrigadas não houveram diferenças significativas entre os clones nos valores absolutos de condutância estomática, tanto a -1,5 quanto -3,0 MPa de potencial hídrico (Figura 2B).

Pinheiro *et al.* (2004) em experimentos com estes mesmos clones em vasos de 120 litros, onde a taxa de estresse é imposta de forma mais lenta devido ao tamanho do vaso, mostraram declínios de magnitude diferente na condutância estomática e na taxa fotossintética em condições de déficit hídrico severo em relação às condições irrigadas, em cerca de 60 e 50% para o clone sensível (109A) e de 75 e 40% no clone tolerante (120), respectivamente. Silva (2007), em experimentos com estes mesmos clones, porém, em vasos de 12 litros, mostrou que, em condições de déficit hídrico severo, o declínio na condutância estomática e na taxa fotossintética foi de 95 e 88 % para o clone sensível (109A), e de 87 e 85% para o clone tolerante (120), respectivamente. No presente trabalho, em condições de déficit hídrico severo, o declínio na condutância estomática e na taxa fotossintética em relação às condições irrigadas, para o clone sensível foi de 92 e 83 %, e para o clone tolerante foi de 85 e 82% (Figuras 2A e 2B), resultados semelhantes ao apresentado por Silva (2007), onde os experimentos foram conduzidos em vasos do mesmo tamanho.

As taxas transpiratórias mostraram-se reduzidas sob condições de déficit hídrico, e esta redução aconteceu de forma distinta entre os clones (Figura 2C). Em déficit hídrico moderado, o clone sensível apresentou uma redução de 66% em sua transpiração, e o clone tolerante 86,45 % em relação às condições irrigadas (Figura 2C). Este declínio substancialmente maior apresentado pelo clone tolerante (120) em relação ao clone sensível (109A) está relacionado a menores valores de condutância estomática deste clone na ausência do estresse (-0,05 MPa), como observado por Silva (2007). As taxas transpiratórias menores no clone tolerante (120) em relação ao clone sensível (109A) em déficits hídricos moderados refletem uma maior eficiência no uso da água para aquele clone (Figura 2E).

A razão C_i/C_a sob condições irrigadas apresenta-se significativamente maior no clone sensível (109A) em relação ao clone tolerante (120) (Figura 2D), o que é verificado pela maior condutância estomática em paralelo a um equivalente valor de taxa fotossintética. Em déficits hídricos moderados e severos, o clone sensível apresentou uma redução na razão C_i/C_a , em relação às condições irrigadas (Figura 2D).

Entretanto, o clone tolerante (120) mostrou uma manutenção da razão C_i/C_a sob condições de déficit hídrico moderado em relação às condições irrigadas seguido de um aumento sob condições de déficit hídrico severo (Figura 2D). Conforme foi sendo estabelecido o déficit hídrico a condutância estomática foi diminuindo gradativamente assim como a taxa de fotossíntese líquida refletindo em valores constantes da razão C_i/C_a entre condições irrigadas e de déficit hídrico (Figura 2D). Em contraste, a redução na razão C_i/C_a no clone sensível (109A), sob condições de déficit hídrico, pode estar relacionada à diferença na queda substancialmente maior na condutância estomática, em potenciais hídricos de -1,5 MPa, apresentada em relação ao clone tolerante (Figuras 2B e 2D). DaMatta *et al* (2002) observaram que a medida que se intensifica o estresse, pode ocorrer também uma inibição não-estomática da fotossíntese, determinada pelo comprometimento da regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato e também por um decréscimo na atividade de carboxilação dessa enzima.

A taxa de transporte de elétrons sob condições irrigadas e não irrigadas não apresentou diferenças significativas no clone sensível (109A). Por outro lado, no clone tolerante (120), a taxa de transporte de elétrons sob condições de déficit hídrico moderado não apresentou diferenças significativas em relação à condição irrigada, mas apresentou uma queda sob condições de déficit hídrico severo em relação às condições irrigadas e de déficit hídrico moderado (Figura 3A). A diminuição na taxa de transporte de elétrons no clone tolerante em potenciais hídricos severos pode ser um bom indicativo que neste clone pode estar ocorrendo uma modulação na expressão de proteínas do fotossistemas para reduzir a captação de energia. Um eficiente controle dos mecanismos fotoquímicos e não-fotoquímicos e ajustamentos na partição do fluxo de elétrons entre processos assimilativos e não-assimilativos minimizam os danos nos fotossistemas (Franco *et al.*, 2002). Takahashi *et al.* (2007) em experimentos com *Arabidopsis* concluiu que o consumo de energia fotoquímica, como ATP e NADPH, através da via fotorrespiratória ajudam a evitar danos fotooxidativos no fotossistema II. Guimarães (2007) mostrou haver uma redução na abundância de PsbP no clone tolerante em condições de déficit hídrico severo. O complexo de evolução do oxigênio responsável pela oxidação da água, está situado na membrana do tilacóide voltado para o lúmen consiste de pelo menos três cadeias polipeptídicas com massa molecular de 33, 23 e 16 kDa (Rivas *et al.* 2007), também chamadas de PsbO, PsbP e PsbQ, respectivamente.

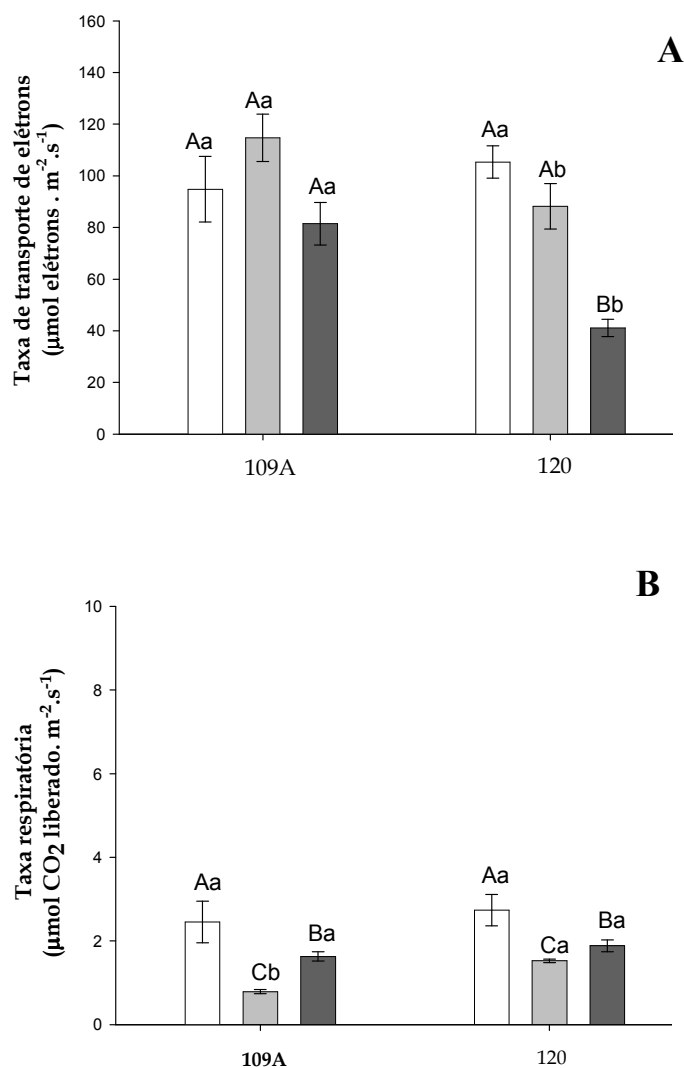


Figura 3. Efeito do déficit sobre a taxa de transporte de elétrons (A) e taxa respiratória (B) em clones de *Coffea canephora*. Clone sensível ao déficit hídrico (109A), e clone tolerante ao déficit hídrico (120). Irrigadas (barras brancas), não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico moderado de -1,5 MPa (barras cinzas), e não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico severo de -3,0 MPa (barras pretas). As colunas representam a média e as barras o erro padrão de cinco repetições. As medições foram realizadas em folhas dos ramos plagiotrópicos medianos. Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre médias de tratamentos diferentes dentro de um mesmo clone e letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em clones diferentes (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas).

A abundância de PsbP tem correlação positiva com a atividade do fotossistema II (Suorsa *et al.*, 2007). Estes resultados em conjunto com os parâmetros fisiológicos do clone 120 em condições de déficit hídrico severo (-3,0 MPa) como diminuição da taxa de transporte de elétrons (Figura 3A), rendimento quântico do fotossistema II (Figura 5A), extinção não-fotoquímica (NPQ) (Figura 5B) e aumento da fração de energia absorvida não utilizada na fotoquímica nem dissipada termicamente (Pe) (Figura 5D) sugerem que limitações na atividade do complexo de evolução da água poderiam ser uma forma de diminuir o fluxo de elétrons em condições de déficit hídrico evitando a produção em excesso de poder redutor e minimizando a produção de espécies reativas de oxigênio.

A taxa respiratória apresentou uma redução no clone sensível (109A) sob condições de déficit hídrico moderado seguido de um aumento sob condições severas, embora ainda significativamente menores que as condições irrigadas (Figura 3B). No clone tolerante (120) as taxas respiratórias mostram uma tendência semelhante ao observado para o clone sensível (109A), entretanto sob condições de déficit hídrico moderado, o clone tolerante apresenta taxas respiratórias significativamente superiores ao clone sensível (109A) (Figura 2C). Guimarães (2007) através do estudo do proteoma diferencial em folhas de *Coffea canephora* sob condições de déficit hídrico severo mostrou que o clone tolerante (120) exibia maior abundância de uma NADPH quinona oxidoreductase em relação ao clone sensível (109A). Sabe-se que as mitocôndrias podem também estar envolvidas em processos de tolerância a estresses oxidativos causados por estresses bióticos ou abióticos (Millar *et al.*, 2001; Moller, 2001). O poder redutor gerado pode também estar sendo drenado através de maior atividade desta NADPH quinona oxidoreductase, que estaria funcionando em conjunto com o sistema antioxidativo na detoxificação de espécies reativas de oxigênio neste clone, e explicaria a redução na taxa de transporte de elétrons neste clone sob déficits hídricos severos.

A ocorrência de fotoinibição crônica pode ser analisada via medição da razão entre a fluorescência máxima e fluorescência mínima (F_V/F_M) na antemanhã (Ishida *et al.*, 1999). Desta forma, quando as condições de déficit hídrico foram impostas, nenhuma alteração significativa foi observada na fluorescência inicial (F_O) e na razão da fluorescência máxima (F_V/F_M) entre as medições realizadas na antemanhã e ao meio-dia, em ambos os clones, evidenciando ausência de fotoinibição crônica (Figura 4).

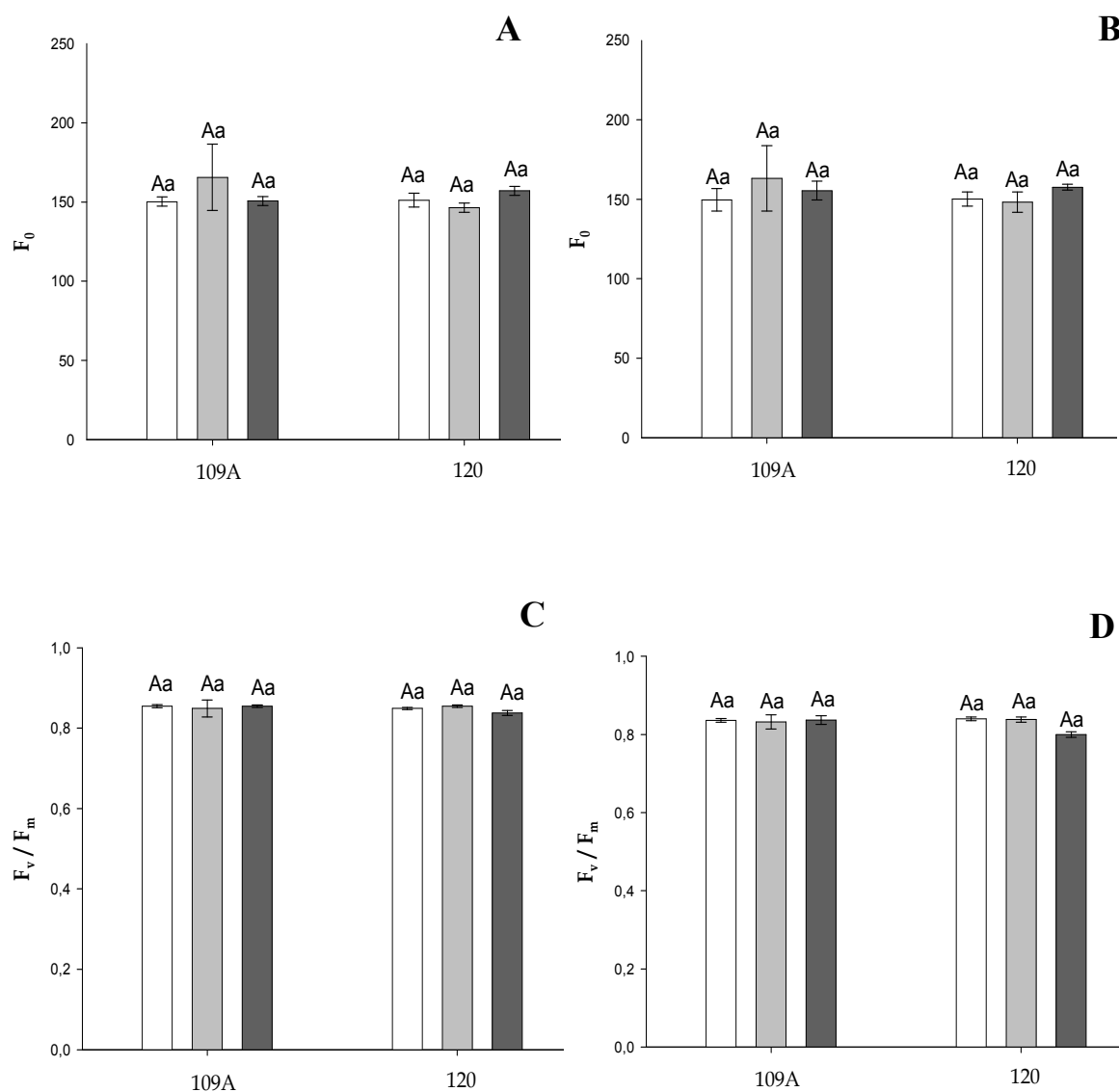


Figura 4. Efeito do déficit hídrico sobre a fluorescência inicial (F_0) e razão F_v/F_m . Clones sensível ao déficit hídrico (109A) e tolerante ao déficit hídrico (120) em condições irrigadas (barras brancas) e não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico moderado de -1,5 MPa (barras cinzas), e não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico severo de -3,0 MPa (barras pretas). Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre médias de tratamentos diferentes dentro de um mesmo clone e letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em clones diferentes (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$). As medições foram realizadas em folhas dos ramos plagiotrópicos medianos. Medições 05:00h, A e C. Medições as 12:00h, B e D. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas).

Nas medições realizadas às 08:00h da manhã e às 12:00h, o clone sensível (109A) não apresentou diferenças significativas no rendimento quântico efetivo (ϕ FSII) entre condições irrigadas e de déficit hídrico (Figuras 5A e B). Sabe-se que as condições de déficit hídrico podem afetar a eficiência do ciclo de Calvin em consumir NADPH resultando em mudanças no estado redox nos cloroplastos e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, afetando o funcionamento do aparelho fotossintético (Asada, 1999; Noctor *et al.*, 2007). Para o clone sensível a manutenção no rendimento quântico efetivo não se reflete em uma manutenção da taxa de assimilação líquida de carbono (Figura 2A), provavelmente devido à baixa disponibilidade de CO₂ em consequência da diminuição da condutância estomática (Figura 2B). Desta forma, a manutenção do rendimento quântico efetivo e na taxa de transporte de elétrons observados no clone sensível (109A), sob condições de déficit hídrico moderado e severo, sugerem que pode estar sendo gerado nesse clone um excesso de poder redutor responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio. Também foi observada uma maior peroxidação lipídica neste clone sob condições de déficits hídricos moderados e severos em relação ao clone tolerante, fato este diretamente relacionado com uma maior formação de espécies reativas de oxigênio (Figura 6).

O clone tolerante (120), para medições realizadas às 08:00h da manhã, não apresentou diferenças significativas no rendimento quântico efetivo entre as condições de déficit hídrico moderado em relação as condições irrigadas (Figura 5A). A manutenção do rendimento quântico efetivo (ϕ FSII) associada a manutenção da taxa de transporte de elétrons (Figura 3A) não foi acompanhada da manutenção da assimilação líquida de carbono nas condições de déficit hídrico moderado em relação as condições irrigadas (Figura 2A). Entretanto, sob estresse hídrico severo, o clone tolerante (120) apresentou uma redução no rendimento quântico efetivo (ϕ FSII) e no transporte de elétrons em relação as condições de déficit hídrico moderado e condições irrigadas. O funcionamento do fotossistema II (PSII) é um indicador muito sensível para identificar estresse em plantas (Ball *et al.* 1994).

O aumento do coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) sob condições de déficit hídrico moderado no clone sensível (109A) sugere que nestas condições também ocorre um aumento da dissipação do excesso de energia na forma de calor através do ciclo das xantofilas (Figura 5C). Franco *et al.* (2007), em trabalhos com espécies lenhosas de cerrado, mostraram que existe uma correlação positiva entre aumentos nos

níveis de NPQ e razão zeaxantina:clorofilas. Para a proteção da maquinaria fotossintética contra estresses oxidativos, as plantas precisam dissipar o excesso de energia luminosa, o que pode ser alcançado pelo aumento nos níveis de xantofilas e carotenos (Asada, 1999). A dissipação térmica exibe um papel na proteção do aparato fotossintético minimizando a geração de espécies reativas de oxigênio que podem potencialmente causar danos, portanto o ciclo das xantofilas exibe um papel central no aumento da dissipação de energia térmica nos centros coletores de luz do fotossistema II. A diminuição da fração de energia não utilizada na fotoquímica e nem dissipada termicamente (P_E) no clone sensível (109A), sob condições de déficit hídrico moderado, demonstra que ambos os mecanismos de dissipação de energia, NPQ e fotorespiração, podem estar sendo acionados neste clone em resposta às condições de déficit hídrico.

Em condições de déficit hídrico severo, tanto o rendimento quântico efetivo do fotossistema II quanto o NPQ as 08:00 h, diminuem no clone sensível (109A) enquanto P_E aumenta, mas não as 12:00h quando há uma aumento da irradiância (Figuras 2B, 5A, 5C). Estes resultados mostram que os mecanismos de dissipação do excesso de energia presentes neste clone, provavelmente não são mais eficientes para drenar o excesso de poder redutor nestas condições. Este fato pode estar associado ao aumento da peroxidação de lipídica, que foi menor no clone tolerante (120) que no clone sensível (109A) (Figura 6). Silva (2007) também mostrou que o clone sensível apresenta um aumento de 60% no extravasamento de eletrólitos nas condições de estresse severo em relação a estresses moderados, sendo este dano oxidativo muito mais expressivo comparado ao clone tolerante (120) nas mesmas condições. Lundin *et al.* (2007) observaram que a proteína extrínseca PsbO do fotossistema II desempenha um importante papel de reparo do fotossistema II regulando a síntese da proteína D1. Guimarães (2007) através de estudos do proteoma diferencial de folhas de *Coffea canephora* submetidas a déficit hídrico de -3,0 MPa, observou que PsbO de 33kDa, apresentou sua abundância aumentada neste clone que pode estar relacionado ao reparo da proteína D1 frente ao aumento do estresse oxidativo.

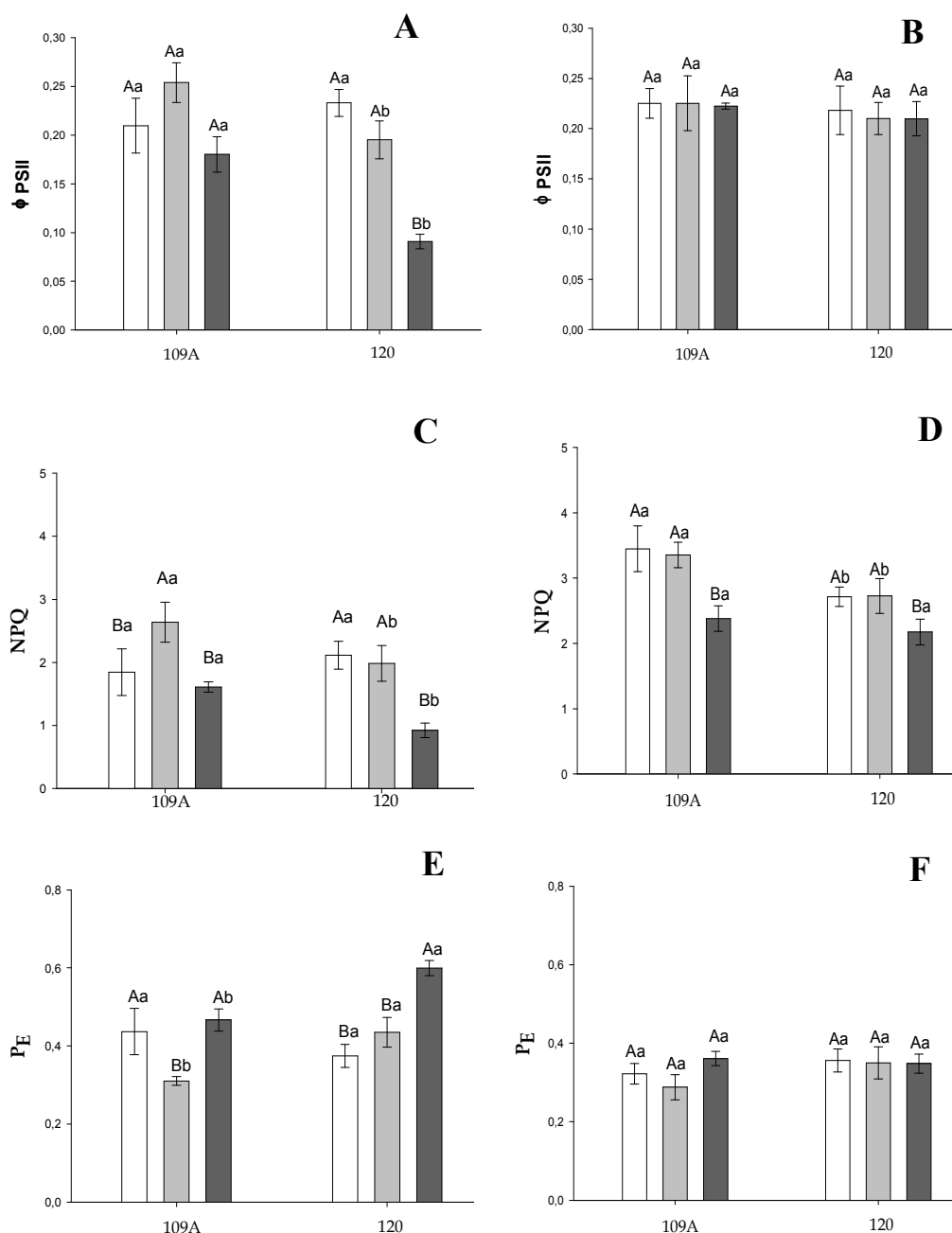


Figura 5. Efeitos do déficit hídrico sobre o $\Phi PSII$ - rendimento quântico do transporte de elétrons (A e B), NPQ – coeficiente de extinção não-fotoquímico (C e D), e P_E - fração de energia absorvida não utilizada na fotoquímica nem dissipada termicamente (E e F) em folhas de *Coffea canephora*. Clones sensível ao déficit hídrico (109A) e tolerante ao déficit hídrico (120) em condições irrigadas (barras brancas), não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico moderado de -1,5 MPa (barras cinzas), e não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico severo de -3,0 MPa (barras pretas). Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre médias de tratamentos diferentes dentro de um mesmo clone e letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em clones diferentes (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$). As medições foram realizadas em folhas dos ramos plagiotrópicos medianos. Medições as 08:00h, A, C, E. Medições as 12:00h, B, D, F. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas).

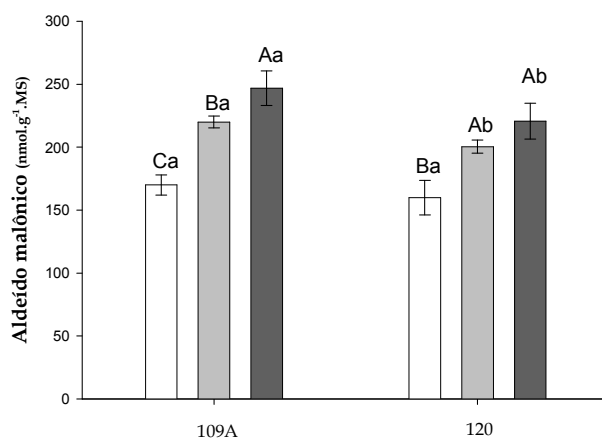


Figura 6. Efeitos do déficit hídrico sobre a peroxidação de lipídeos expressa em concentrações foliares de aldeído malônico (MDA) em clones de *Coffea canephora*.

Clones sensível ao déficit hídrico (109A) e tolerante ao déficit hídrico (120) em condições irrigadas (barras brancas), não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico moderado de -1,5 MPa (barras cinzas) e não-irrigadas submetidas ao potencial hídrico severo de -3,0 MPa (barras pretas). Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre médias de tratamentos diferentes dentro de um mesmo clone e letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em clones diferentes (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas).

Em condições de déficit hídrico severo, o clone tolerante (120) apresenta uma diminuição de 53 % no rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ϕ FSII), 53% no NPQ, sendo estas reduções mais expressivas se comparadas ao clone sensível sob as mesmas condições, além de um aumento de P_E , que se apresenta significativamente maior que aquele observado para o clone sensível (109A) (Figuras 2B, 5A, 5C). Este fato poderia ser traduzido em maiores danos oxidativos no clone tolerante (120) em relação ao clone sensível (109A). Porém, foi observado que o clone tolerante apresenta valores significativamente menores de peroxidação lipídica se comparado às mesmas condições com o clone sensível (109A) (Figura 6).

Lima *et al.* (2002) e Pinheiro *et al.* (2004) verificaram danos celulares em menor extensão no clone tolerante (120), sugerindo que um aumento nos processos oxidativos deve ter ocorrido no clone sensível (109A). DaMatta & Ramalho (2006) propuseram que um sistema antioxidante mais eficiente pode apresentar um papel expressivo na tolerância à seca. Silva (2007) observou um aumento muito mais pronunciado nas atividades de peroxidase do ascorbato e catalase no clone sensível (109A), em detrimento do clone tolerante (120) sugerindo que os mecanismos antioxidativos teriam uma maior atividade frente a maior geração de espécies reativas de oxigênio no clone sensível. Contudo, Lima *et al.* (2002) observaram que as enzimas do sistema antioxidativo como superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase possuem maior atividade sob condições de déficit hídrico no clone tolerante (120), em detrimento no clone sensível (109A). Desta forma, fica impossível inferir sobre a relação existente entre o sistema antioxidativo e nível de espécies reativas de oxigênio nesses resultados, uma vez que não foi feita a determinação de atividade enzimática e nível de espécies reativas de oxigênio para um melhor entendimento.

Quando estes mesmos parâmetros de fluorescência foram avaliados no clone sensível (109A), e no clone tolerante (120), em condições de déficit hídrico ao meio-dia (Figuras 5B, 5D e 5F), o padrão observado foi diferente. O rendimento quântico efetivo (ϕ FSII) não apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (Figura 5B). O NPQ não apresentou diferenças entre condições irrigadas e de déficit hídrico moderado, entretanto sob condições de déficit hídrico severo exibiu uma redução significativa em relação às outras condições (Figura 5D). E ainda P_E não apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos e regimes hídricos.

Os parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência obtidos nestes clones apresentam-se de forma distinta do que já foi apresentado para estes clones em

condições de déficit hídrico semelhantes, como relatado por Silva (2007). As condições meteorológicas durante a realização dos experimentos foram distintas, refletindo diferenças na intensidade de radiação solar, diferenças na demanda evaporativa da atmosfera, os quais resultaram em diferenças nas taxas de progressão do déficit hídrico entre os diferentes experimentos. Estas condições podem ter refletido em um controle diferencial de mecanismos fotoquímicos e não-fotoquímicos, e ajustamentos na partição do fluxo de elétrons entre processos assimilativos e não-assimilativos nestes clones.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho estão de acordo com outros trabalhos previamente realizados (Lima *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2004; Guimarães, 2007; Silva, 2007) quanto aos comportamentos diferenciais em resposta às condições de déficit hídrico entre os dois clones. Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que o clone sensível (109A) apresenta mecanismos relacionados a aumento da dissipação térmica (NPQ) como dreno do excesso de energia sob déficits hídricos moderados. A diminuição de P_E associado ao aumento de NPQ sob condições de déficit hídrico moderado, demonstra que podem estar sendo acionados mecanismos como o ciclo das xantofilas em resposta às condições de déficit hídrico. Entretanto, em condições de déficit hídrico severo, estes mecanismos não se apresentam mais eficientes neste clone, o que estaria relacionado também a uma menor eficiência do sistema antioxidativo mostrado por Lima *et al* (2002). Isto associado aumento na abundância de uma proteína extrínseca dos fotossistemas II (PsbO) relatado por Guimarães (2007) neste clone, pode estar relacionado com um maior reparo da proteína D1 em vista de um aumento do estresse oxidativo nestes clones. Já no clone tolerante (120), a redução no rendimento quântico efetivo associado à redução nas taxas de transporte de elétrons e no coeficiente de extinção não-fotoquímica, seguido de um aumento em P_E , que não são substancialmente traduzidos em um aumento em danos oxidativos, sugerem uma modulação na expressão de proteínas do fotossistemas para reduzir a captação de energia e outros tipos de mecanismos de dreno desse excesso de energia. Estes fatos estão diretamente relacionados com resultados de Guimarães (2007) que observou a redução na abundância de PsbP no clone tolerante em condições de déficit hídrico severo. Além disso, estes resultados podem estar correlacionados com abundância de uma NADPH quinona oxidoreductase mitocondrial mostrado por Guimarães (2007) no clone tolerante que estaria drenando o excesso de poder redutor e funcionando em conjunto com o sistema antioxidativo na detoxificação de espécies reativas de oxigênio neste clone.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asada K** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:601-639, 1999
- Baker NR** Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. In *Water deficit plant responses from cell to community* (J.A.C. Smith & H. Griffiths, eds.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, 221-235, 1993
- Ball MC, Butterworth JA, Roden JS, Christian R, Egerton, JJG** Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 311-319, 1994
- Cramer GR, Erguil A, Grinplet J, Tillett RL, Tattersall EAR, Bohlman M, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, Quilici D, Schauch KA, Schooley DA, Cushman JC** Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional Integrative Genomics*, 7:111-134, 2007
- DaMatta FM & Ramalho JDC** Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1): 55-81, 2006
- DaMatta FM** Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan A, ed. *Advances in plant physiology*. Scientific Publishers, 5: 227-265, 2003
- DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME** Limitations to photosynthesis in *Coffea Canephora* as a result of nitrogen and water availability *Journal of Plant Physiology*, 159: 975-981, 2002
- DaMatta FM, Silveira JSM, Ducatti C, Loureiro ME** Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: *Resumo expandido, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Embrapa Café, Brasília, 907-910, 2000
- DaMatta FM, Maestri M, Barros RS** Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica*, 34: 257-264, 1997
- DaMatta FM, Maestri M, Barros RS, Regazzi AJ** Water relations of Coffee leaves (*Coffea Arabica* and *Coffea canephora*) in response to drought. *Journal of Horticultural Science*, 68: 741-746, 1993

- Dias PC** Variação especial da fotossíntese e de mecanismos de fotoproteção no cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Viçosa, UFV, 2006, 34 pp. (Tese de Mestrado)
- Demming-Adams B, Adams WW, Baker DH, Logan BA, Bowling DR, Verhoeven AS** Using chlorophyll fluorescence to access the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98: 253-264, 1996
- Ferrão RG, Fonseca AFA, Ferrão MAG** Avaliação de clones elites de café conilon em condição de estresse hídrico no estado do Espírito Santo. *In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. EMBRAPA-CAFÉ, Poços de Caldas, 402-404, 2000*
- Franco AC, Matsubara S, Orthen B** Photoinhibition, carotenoid composition and the co-regulation of photochemical and non-photochemical *quenching* in neotropical savanna trees. *Tree Physiology*, 27:717-725, 2007
- Franco AC & Lüttge U** Midday depression in savanna trees: coordinated adjustments in photochemical efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia*, 131:356-365, 2002
- Genty B, Briantais JM, Baker NR** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochemical Biophysics Acta*, 990, 87-92, 1989
- Guimarães, BLS** Caracterização molecular da resposta adaptativa de clones de *Coffea canephora* em condições de déficit hídrico e otimização de metodologia para identificação de proteínas de folhas e raiz de café (*Coffea sp.*). Viçosa, UFV, 2007, 61p. (Tese de Mestrado)
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK** Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604-611, 1999
- Krause GH, Weiss E** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basis. *Annual review of Plant Physiology in Plant Molecular Biology*, 42: 313-249, 1991
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME** Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 239-247, 2002
- Millar H, Considine MG, Day DA, Whelan J** Unraveling the role of mitochondria during oxidative stress in plants. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 51: 201-205, 2001

- Moller LM** Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology Biology*, 52: 561-591, 2001
- Noctor G, De Paepe R, Foyer CH** Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 12, 125–134, 2007
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Ducatti C** Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany*, 96: 101–108, 2005
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME** Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, 167: 1307–1314, 2004
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT** Effects of long-term drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. Kouillon) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 56:263-273, 2006
- Rivas JDL, Heredia P, Romam A** Oxygen-evolving extrinsic proteins (PsbO,P,Q,R): bioinformatic and functional analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767: 575-582, 2007
- Silva VA** Caracterização fisiológica da tolerância à seca em *Coffea canephora*: contribuição relativa do sistema radicular e da parte aérea. Viçosa: UFV, 2007b 57p. (Tese de Doutorado)
- Suorsa M & Aro E** Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants. *Photosynthesis Research*, 93: 89-100, 2007
- Takahashi S, Bauwe H, Badger M** Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage process in *Arabidopsis sp.*. *Plant Physiology*, 144: 487-494, 2007
- Tambussi EA, Bartoli CG, Beltrano J, Guiamet JJ, Araus JL** Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiology Plantarum*, 108: 398-404, 2000
- Tardieu F & Simonneau T** Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany*, 49: 419-432, 1998