

BRENO LOURENZZO SALGADO GUIMARÃES

PROTEÔMICA DIFERENCIAL EM CLONES DE
***Coffea canephora* SOB CONDIÇÕES DE 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

2007

BRENO LOURENZZO SALGADO GUIMARÃES

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL EM CLONES DE
Coffea canephora SOB CONDIÇÕES DE 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: 18 de maio de 2007

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Co-orientador)

Prof^ª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Co-orientadora)

Prof^ª. Maria Cristina Baracat-Pereira

Dr. Richard Hemmi Valente

Prof^ª. Andréa Miyasaka de Almeida
(Orientadora)

Ao João Bosco Salgado Guimarães e Marly de Oliveira, meus pais, pelo exemplo de vida, dedicação e amor incondicional. Por muitas vezes terem abdicado dos seus sonhos pela realização dos meus, Obrigado!

Com amor Dedico

Aos meus irmãos Gerson, Bruno, João e Ramon, pelo carinho;

Aos meus amigos de Viçosa, em especial todos da república 'OS MULAMBOS' e os amigos de laboratório pela alegria transmitida;

A todos meus tios e tias, primos e primas, amigos e amigas, pela confiança,

Ofereço

Da Felicidade (Mario Quintana)

*Quantas vezes a gente, em busca de aventura,
Procede tal e qual o avozinho infeliz:
Em vão, por toda parte, os óculos procura,
Tendo-os na ponta do nariz!*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, de maneira especial ao Departamento de Biologia Vegetal e ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade e ajuda para a realização deste curso.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudos e bolsas de iniciação científica, respectivamente.

Aos meus pais, Marly de Oliveira e João Bosco Salgado Guimarães, por todo apoio, por estarem sempre ao meu lado, por permitir a realização dos meus sonhos acadêmicos. Por serem o que são para mim: TUDO.

Aos meus irmãos Gerson, Bruno (Pit), João (Tiquinho) e Ramon que mesmo distante sempre me apoiaram. Que nos momentos mais críticos, dessa minha caminhada, fizeram-me encontrar forças a cada dia. Por saber que muito do que sou faz parte dos sonhos que nós sonhamos juntos. Por serem muito mais que irmãos.

Aos meus irmãos de escolha: Bruno Saud, Edson Ribeiro Luiz, Edmar Guimarães Manduca e Rodrigo da Silva Rocha que fizeram da república “OS MULAMBOS” meu segundo lar. Pelas histórias que hei de contar para meus netos e pelos ensinamentos. Por estarem sempre de bom humor e tornarem a república o melhor lugar para se estar em Viçosa. Vou sentir MUITA saudade!

Ao meu grande amigo, José Henrique, que sempre me ensinou a ter Força Sempre!

Ao meu amigo e irmão, José Boroni, que sempre esteve ao meu lado e me ensinou o significado da palavra amizade.

À minha amiga inseparável de curso: Rejane. Obrigado por sua amizade incondicional.

Às amigas: Geórgia, Vânia, Karla, Rejane, Carol, Elaine Cabrine, Hebréia, Meire que estiveram sempre ao meu lado. Foram as irmãs que eu não tive. Amo vocês!

Aos amigos do Laboratório: Vânia, Gustavo Resque, Karine Dias, Rita, Hebréia, Meire, Maximiler, Camilo e Maurício pelas ajudas, conselhos, amizade e confiança irrestrita.

Ao Maurício que além de me ajudar a desenvolver o projeto foi sempre meu amigo e irmão.

Ao meu primeiro orientador João Marcos de Araújo que sempre foi muito mais que um orientador, foi um amigo. Que me ensinou a arte das pesquisas, ensinou-me vibrar a cada vitória e levantar a cada tropeço.

Ao prof. Marcelo Ehlers Loureiro que sempre me desafiou e do seu jeito me ensinou a ir à luta. Obrigado também por todos os ensinamentos e confiança em mim.

Aos Professores, Marco Aurélio Pedron e Silva, Wagner Campos Otoni e Marco Antonio Oliva Cano que sempre me deram conselhos e ajudaram no meu trabalho e que, acima disso, sempre me trataram como amigo, como filho.

À comissão orientadora, Andréa Miyasaka de Almeida, Marcelo Ehlers Loureiro, Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Maria Cristina Baracat que me apoiaram na realização deste trabalho.

Ao Dr. Richard Hemmi Valente do laboratório de toxilogia da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) – RJ e o Dr. Paolo DiMascio e a especialista Izaura N. Toma do Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), pelas análises, assistência e ensinamentos em espectrometria de massa.

Ao Dr. Richard Hemmi Valente meu orientador “virtual”, obrigado por todas as dicas e ensinamentos. Foi de muita valia!

Aos meus amigos e funcionários do Laboratório de Fisiologia Vegetal pela convivência e apoio durante todo esse tempo.

A todos que direta ou indiretamente participaram desta conquista...

OBRIGADO!!!

BIOGRAFIA

BRENO LOURENZZO SALGADO GUIMARÃES nasceu em Oliveira, MG, aos 18 dias do mês de novembro de 1979. Em dezembro de 1998, concluiu o Curso de Técnico em contabilidade e o científico, em Oliveira, MG. Em março de 2000, iniciou o Curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em janeiro de 2005. Em março do mesmo ano, iniciou seus estudos no curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na mesma Instituição.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
Introdução geral	1
Referência Bibliográfica	5
Capítulo I: Evaluation of methods for protein extraction from leaf and root of coffee plants for use in two-dimensional gel electrophoresis analysis	7
Introduction	9
Materials and methods	10
Results and discussion	14
Conclusions	22
References	23
Capítulo II: Proteínas diferencialmente expressas em genótipos contrastantes de <i>Coffea canephora</i> submetidos a condições de déficit hídrico	25
Introdução	27
Material e Métodos.....	29
Resultados e Discussão.....	35
Conclusões	52
Referências Bibliográficas	53

RESUMO

GUIMARÃES, Breno Lourenzzo Salgado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2007. **Proteômica diferencial em clones de *Coffea canephora* sob condições de déficit hídrico.** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

A tolerância à seca é o resultado de numerosas características anatômicas, morfológicas e fisiológicas, de natureza constitutiva ou indutiva. Vários mecanismos são responsáveis pela tolerância, e salienta-se a necessidade de que sejam identificados genes e seus produtos que estejam envolvidos nas diferentes respostas que conferem tolerância à seca em café. Este trabalho teve como objetivos verificar a resposta adaptativa de clones de *Coffea canephora* ao déficit hídrico além de identificar proteínas responsivas a esse estresse. Mudanças dos clones 120 (genótipo tolerante à seca) e 109A (genótipo sensível à seca) foram cultivadas em vasos de 12 L e o déficit hídrico foi alcançado suspendendo a irrigação até que as plantas atingissem um potencial hídrico de antemanhã (ψ_{am}) de -3,0 MPa. A redução do potencial hídrico (ψ_{am}) nas plantas que foram submetidas ao déficit hídrico foi acompanhada de reduções nas taxas de assimilação líquida do carbono (A) e da condutância estomática (g_s). Foi observado um aumento mais pronunciado no extravasamento de eletrólitos assim como na atividade de enzimas antioxidantes no clone sensível ao déficit hídrico (109A). Para as análises de proteoma, foram adaptados protocolos de extração de proteínas de folha e raiz de café, compatíveis com a eletroforese em gel bidimensional e a identificação de proteínas por espectrometria de massa. Os protocolos adaptados mostraram-se eficientes na retirada de contaminantes não protéicos, em especial polifenóis na extração de proteína de folhas e polissacarídeos na extração de proteínas de raiz. Os géis obtidos mostraram-se reproduzíveis e ausentes de arrastes, apresentando os *spots* individualizados. Os dados de proteoma indicam que um dos mecanismos de aclimatação ao estresse hídrico usado por *Coffea canephora* seria a fotorrespiração. Os resultados obtidos indicam a existência de mecanismos de adaptação a um possível dano oxidativo, como o aumento na expressão de alguns chaperones moleculares e de algumas proteínas dos fotossistemas, e a maior expressão de algumas isoformas da subunidade maior da Rubisco. A atividade destas proteínas poderia contribuir para a manutenção do papel antioxidativo da fotorrespiração. Por outro lado, somente no clone tolerante, sob déficit hídrico, foi observada a maior acumulação de uma NADPH-quinona redutase e a manutenção da abundância da glutamina sintase. Estes resultados sugerem que a primeira enzima pode

ter importante papel no mecanismo antioxidativo associado à tolerância à seca neste clone e a segunda enzima um importante papel da manutenção da assimilação da amônia e da fotorrespiração nestas condições.

ABSTRACT

GUIMARÃES, Breno Lourenzzo Salgado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Brazil, May 2007. **Differential proteomics of *Coffea canephora* clones upon water deficit conditions** Adviser: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-advisers: Marcelo Ehlers Loureiro and Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Drought tolerance can result from numerous anatomical, morphological and physiological characteristics that can be from constitutive or inductive nature. Several mechanisms are responsible for the tolerance, and it is pointed out the need that genes and their products involved in the different responses that confer coffee drought tolerance. The aim of this work was the verification of the adaptative responses of *Coffea canephora* clones to drought stress and identify proteins responsive to that stress. Plants of the clones 120 (drought tolerant genotype) and 109A (drought sensitive genotype) were cultivated in vases of 12 L and water deficit was reached by suspending the irrigation until the plants reached -3.0 MPa predawn hydric potential (ψ_{am}). The reduction in the ψ_{am} in the plants upon drought stress was accompanied by reductions in liquid carbon assimilation (A) and in stomatal aperture (g_s). A more pronounced increase was observed in electrolytes leakage as well as in the activity of antioxidant enzymes in the sensitive genotype (109A) upon water stress. For proteome analysis, we adapted a protocol for coffee leaf and root protein extraction, which was compatible with two-dimensional gel electrophoresis and protein identification by mass spectrometry. The adapted protocols were efficient in the retreat of non proteic polyphenol contaminants from leaf protein extracts and polysaccharides from root proteins. The processed 2D gels were reproducible, presenting individualized spots, without drags. The proteome data indicated that one of the mechanisms of drought stress acclimatization presented by *Coffea canephora* would be photorespiration. The obtained results indicated the existence of adaptation mechanisms to a possible oxidative damage, as the increase in the expression of molecular chaperones and proteins from the photosystems, as well as the increased expression of isoforms of the largest Rubisco subunit. The activity of these proteins can contribute to the maintenance of the antioxidative role of photorespiration. In contrast, only in the tolerant clone under drought stress, the accumulation of a NADPH-quinone reductase was increased and glutamine synthase was unaltered. These results suggest that the first enzyme could have an important role in the antioxidative mechanism associated to the drought tolerance.

presented by this clone, and the second enzyme would be associated to the maintenance of the assimilation of the ammonium and of the photorespiration in these conditions.

Introdução geral

O déficit hídrico desencadeia uma série de respostas nas plantas, desde a percepção, a ativação de rotas de sinalização e alterações em nível de expressão gênica levando às alterações fisiológicas no crescimento e desenvolvimento das plantas. O déficit hídrico leva à mudança na expressão gênica, como evidenciado pela síntese de novas proteínas e de RNA mensageiro, e essas mudanças vão depender da espécie vegetal e do estágio de desenvolvimento, além da severidade do estresse. Muitas são as rotas que apresentam alterações decorrentes do estresse, entre as quais se destacam as alterações na tradução de proteínas envolvidas nas cascatas de sinalização, controle transcricional, proteção a componentes celulares como membranas e proteínas, ajustamento osmótico, movimento de água e íons, e de destoxificação (Bray, 1993; Wang *et al.* 2003).

Mais de 90 espécies do gênero *Coffea* foram identificadas, porém, somente duas, *Coffea canephora* Pierre e *Coffea arabica* L. (café Arábica), têm importância econômica. A espécie *C. canephora* apresenta dois grupos distintos em função da região de ocorrência: o grupo denominado *kouillou* (ou conilon), e o grupo robusta. Plantas do grupo robusta são caracterizadas por um vigoroso sistema radicular, o que lhes confere alta capacidade de absorção da água do solo (Alfonsi *et al.*, 2005). Entretanto, tais plantas parecem apresentar um controle estomático deficiente da transpiração (Fahl *et al.*, 2001), o que concorreria para uma rápida exaustão da água do solo e conseqüentemente baixa tolerância à seca. Por outro lado, em conilon parece haver um controle estomático da transpiração, em bases relativas, mais eficiente que em robusta, apesar do grande poliformismo observado em clones do grupo conilon no que diz respeito à tolerância à seca (DaMatta e Rena, 2001; DaMatta, 2004; DaMatta e Ramalho, 2006). O café canéfora, apesar de fornecer uma bebida de qualidade inferior àquela fornecida por grãos de café arábica, possui uma produtividade crescente no Brasil e no mundo. Os estados do Espírito Santo, Acre e Rondônia são os maiores produtores brasileiros de café canéfora, conferindo ao Brasil a posição de maior exportador do mundo, principalmente quanto à exportação de café solúvel (Silva e Leite, 2000). Ademais, o café canéfora é mais indicado para regiões de baixa altitude com temperaturas médias anuais elevadas (de 22°C a 26°C) e dentre certos limites, a regiões com um período seco mais prolongado, pois em geral, clones de café canéfora apresentam maior tolerância ao déficit hídrico se comparado a genótipos de café arábica (Fazuoli, 1986).

A maior parte das lavouras de café canéfora vem sendo formada, nos últimos anos, a partir de mudas clonais selecionadas de matrizes muitas vezes cultivadas sob irrigação. Os clones assim obtidos, uma vez conduzidos com restrição hídrica, exibem grande variabilidade quanto à tolerância à seca (Da Matta *et al.*, 1997; DaMatta *et al.*, 2003). Em paralelo à seleção de genótipos tolerantes, torna-se primordial avaliar fisiológica e bioquimicamente fatores relativos ao desempenho das plantas sob restrição hídrica (Müller e Whitsitt, 1997). Dentre estes fatores, alguns vêm sendo identificados como primordiais na tolerância ao estresse hídrico, como a eficiência de extração de água do solo, o ajustamento osmótico, a eficiência do uso de água, a capacidade fotossintética, a modulação da partição de assimilados e as defesas contra danos oxidativos (Ludlow e Muchow, 1990). Lima *et al.* (2002), ao estudar dois clones contrastantes submetidos a déficit hídrico em vaso de 6 litros, propuseram que a tolerância poderia estar, em parte, associada ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Por outro lado, Pinheiro *et al.* (2004) não observaram uma associação direta entre proteção contra o estresse oxidativo e tolerância ao déficit hídrico, quando analisaram quatro clones de *Coffea canephora* submetidos ao estresse hídrico prolongado (vasos de 120L), não corroborando com o sugerido. DaMatta (2003) observou que o melhor rendimento na colheita do clone tolerante, comparado com um sensível, era associado com manutenção da área foliar e manutenção de potenciais hídrico dos tecidos, como consequência de uma menor condutância estomática (g_s), resultando em menor discriminação isotópica do carbono. Apesar do acima exposto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao estresse hídrico nos diferentes clones de *Coffea canephora*.

Com o final do seqüenciamento do genoma do café, resultado de uma parceria entre a FAPESP e um consórcio formado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e outras instituições de pesquisa, entre elas a UFV, foram geradas mais de 155 mil seqüências de genes (*expressed sequence tag* - EST) que estão sendo caracterizadas funcionalmente. Porém, as seqüências geradas não fornecem respostas quantitativas e nem qualitativas do produto final de um gene, as proteínas. A quantidade de proteínas não é sempre correlacionada com a quantidade de mRNA, especialmente para proteínas de baixa abundância. Além disso, muitas proteínas sofrem modificações pós-traducionais como remoção de peptídeos sinais, fosforilação, glicosilação que são extremamente importantes para atividades e localização sub-celular. Uma forma de melhor compreender as informações geradas pelo seqüenciamento pode ser aliando-as ao estudo do proteoma. A proteômica vem sendo

definida como a análise sistemática de conjuntos de proteínas presentes em tecidos, células ou compartimentos sub-celulares, usada para fins simples como identificar proteínas relacionadas a processos definidos, ou para fins tão complexos quanto à caracterização de modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína (van Wijk, 2001). Recentes avanços na proteômica têm permitido uma análise mais quantitativa, reprodutível, aliada à identificação de um maior número de proteínas. Análises com as fontes de ionização do tipo *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) ou *Electrospray Ionization* (ESI) são atualmente as técnicas mais recomendáveis para o estudo de compostos não-voláteis e termolábeis, como peptídios e proteínas (Glish e Vachet, 2003). Ambas as técnicas, associadas ao analisador *Time-of-flight* (TOF) e às técnicas iniciais de preparo de amostras, podem fornecer a massa de um grande conjunto de peptídeos em tempo curto, e com alta acurácia (Johnsson, 2001). Estudos recentes têm demonstrado que na ausência do seqüenciamento genômico, dados de etiquetas de seqüências expressas (EST) têm sido utilizados para identificação de proteínas (Mann *et al.*, 2001; Porubleva *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2003).

Tendo em vista a variedade e complexidade dos processos fisiológicos envolvidos nos mecanismos de tolerância à seca, são necessárias informações que possibilitem selecionar aquelas proteínas que mais contribuam para o estabelecimento do processo de tolerância, de forma a conduzir estudos mais aprofundados que validem a significância de sua participação nestes mecanismos de tolerância. Atualmente, as técnicas de biologia molecular podem oferecer alternativas para a redução do tempo de obtenção de novos genótipos, visto que o melhoramento tradicional para essa cultura é um processo moroso e está sujeito ao risco de gerar genótipos com tolerância ao estresse hídrico limitado a específicos ambientes.

Em café pouco se sabe sobre as proteínas que são alteradas em condições de déficit hídrico. Identificar as proteínas de café que são alteradas sob déficit hídrico, principalmente em clones contrastantes, pode permitir o entendimento das rotas de tolerância que são ativadas nesta espécie. Uma outra vantagem seria usar esses dados aliando-os ao melhoramento clássico.

A presente proposta visa integrar as informações geradas por DaMatta (1997, 2001, 2003, 2004 e 2006) acerca das relações fisiológicas de plantas de café canéfora em resposta ao déficit hídrico aliando-as a identificação de proteínas que estejam relacionadas à tolerância. A identificação das proteínas envolvidas nas respostas ao déficit hídrico nos clones contrastantes permitirá correlacioná-las aos mecanismos da

tolerância diferencial. Além disso, o presente estudo pode proporcionar resposta a cerca das proteínas que têm sua abundância aumentada e/ou diminuída e as prováveis rotas modificadas em café quando esse é exposto ao déficit hídrico.

Referência Bibliográfica

- Alfonsi E.L., Fahl J.I., Carelli M.L.C., Fazuoli L.C.** Crescimento, fotossíntese e composição mineral em genótipos de *Coffea* com potencial para utilização como porta enxerto. *Bragantia* 64:1-13, 2005.
- Bray E. A.** Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* 103: 1035–1040, 2003.
- DaMatta F.M.** Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan A, ed. *Advances in plant physiology*. Vol. 5. Jodhpur: Scientific Publishers, 227–265, 2003.
- DaMatta F. M., Maestri M., Barros R. S.** Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica* 34, 257-264, 1997.
- DaMatta F.M. e Ramalho J.D.C.** Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review *Brazilian Journal of Plant Physiology.*, 18:55-81, 2006.
- DaMatta F.M.** Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 1-6, 2004.
- DaMatta F.M. and Rena, A.B.** Tolerância do café à seca. In: Zambolim, L. (Ed.). *Tecnologias de Produção de Café com Qualidade*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 65-100, 2001.
- Fahl J.I., Carelli M.L.C., Menezes H.C., Gallo P.B., Travelin P.C.O.** Gas exchange, growth, yield and beverage quality of *Coffea arabica* cultivars grafted onto *C. canephora* and *C. congensis*. *Experimental Agriculture* 37: 241-252, 2001.
- Fazuoli L.C.** Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena, A.B.; Malavolta, E.; Rocha, M.; Yamada, T. (Eds.), *Cultura do cafeeiro - fatores que afetam a produtividade*. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, 87-113, 1986.
- Glish G.L. and Vachet, R.W.** Review - The basic of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature*, 2: 140-150, 2003.
- Johnsson A.P.** Review – Mass spectrometry for protein and peptide characterization. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, 58: 868-884, 2001.
- Lima A.L.S., DaMatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R., Loureiro M.E.** Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 47: 239-247, 2002.

- Ludlow M. M. and Muchow R. C.** A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Advance in Agronomy*, 43:107-153, 1990.
- Mann M., Hendrickson R.C., Pandey A.** Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*. 70: 437-473, 2001.
- Müller J. E. and Whitsitt M. S.** Plant cellular responses to water deficit. In: Belhassen, E. (Ed.), *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis*. Dordrecht, Kluwer. 41-46, 1997.
- Pinheiro H.A., DaMatta F.M., Chaves A.R.M., Fontes E.P.B., Loureiro M.E.** Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clone of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Sci.* 167: 1307-1314, 2004.
- Porubleva L., Vander Velden K., Kothari S., Oliver D.J., Chitnis P.R.** The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* 22:1724-1738, 2001.
- Silva O.M. and Leite C.A.M.** Competitividade e custos do café no Brasil e no exterior. In: Zambolim, L. (Ed.), *Café – produtividade, qualidade e sustentabilidade*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 27-48, 2000.
- Van Wijk K.J.** Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology*, 126: 501-8, 2001.
- Wang W., Vinocur B., Altman A.** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance *Planta*, 218: 1–14, 2003.
- Watson B.S., Asirvatham V.S., Wang L., Sumner L.W.** Mapping the Proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology*, 131:1104-1123, 2003.

Capítulo I

Evaluation of protein extraction methods from coffee leaves and roots for two-dimensional gel electrophoresis analysis

Guimarães, B.L.S.¹; Vieira, M.A.¹; Silva, V.A.¹; Loureiro, M.E.¹; Baracat-Pereira, M.C.²; Fontes, E.P.B.²; Almeida, A.M.^{1*}

1-Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil; 2-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil.

* Author to whom correspondence should be addressed: amalmeida@ufv.br

Abstract

Proteomic analysis of plant tissues involves a number of practical challenges that are typically more problematic than with other organisms. Most plant tissues do not provide a ready source of proteins and thus need special precautions. The coffee tissue is notoriously recalcitrant to common protein extraction methods due to high levels of interfering compounds, mainly (poly) phenols. In this work three protein extraction protocols for coffee leaf and root tissues were evaluated: (1) Protein extraction based on TCA (trichloroacetic acid) in acetone precipitation; protocol (2) Protein extraction based on TCA precipitation and phenol extraction followed by methanol/ammonium acetate precipitation, and protocol (3) Protein extraction based on phenol extraction with methanol/ammonium acetate precipitation. The TCA precipitation and phenol extraction methanol/ammonium acetate precipitation protocol (protocol 2) showed to be efficient for protein extraction from both leaf and root tissues. However, for root protein extraction, a modified protocol 3 appeared to be more robust allowing an efficient extraction with reduced time and a decrease of protein loss during initial washings. This study allowed the validation of protocols for coffee leaf- and root-protein extraction that can be used as guides for the experimental setup for protein extraction of other species containing various interfering elements.

Keywords: coffee, mass spectrometry, protein extraction method, proteome and two-dimensional gel electrophoresis.

Introduction

Proteomic has been defined as the systematical analysis of protein sets in tissues, cells or sub-cellular compartments, used for a simple purpose such as to identify proteins related to a defined process, or for purposes as complex as the characterization of post-translational modifications and protein-protein interactions (van Wijk, 2001). Recent advances in proteomics have permitted a more quantitative and reproductive analysis of a greater number of proteins. Currently the most suitable approach towards this goal is separation and visualization of proteins from crude tissue extracts by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by the identification and characterization of the isolated proteins by mass spectrometric techniques (Gobom *et al.* 2001, Nordhoff *et al.* 2001). Two dimensional electrophoresis (2-DE) is one of the most efficient and powerful methods to study complex patterns of gene expression at the level of proteins (Celis *et al.* 1998, Gygi *et al.* 2000). Despite its definite limitations, 2-DE is quantitatively the strongest technique, is cost-effective, and is the most suitable proteomic approach for species which the genome is not (fully) sequenced. Sample preparation is a critical step and is absolutely essential for good results, since a proteome consists of many proteins with different properties including differences in solubility. The principle of the technique is based on the individualization of proteins in 2-DE that depends on efficient extraction of proteins and absence of the interfering compounds.

Proteomic analysis of plant tissues involves a number of technical challenges that are typically more problematic than with other organisms. Most plant tissues do not provide a ready source of proteins and thus need special precautions. The cell wall and the vacuole make up the majority of the cell mass, with the cytosol representing only 1–2% of the total cell volume (Carpentier *et al.* 2005). Consequently, plant tissues have a relatively low protein/volume content compared to bacterial or animal tissues. The cell wall and the vacuole are both associated with numerous substances responsible for irreproducible and inferior results such as proteolytic breakdown, streaking, and charge heterogeneity. The electrophoretic separation of proteins from plant tissue extracts is often complicated by other endogenous non-protein contaminants, such as organic acids, lipids, (poly)phenols, pigments and terpenes (Granier, 1988). The contaminants are a particular problem for 2-DE, resulting in horizontal and vertical streaking, smearing and reduction in the number of distinctly resolved protein spots.

Coffee is currently grown in 80 countries in four continents. Brazil is the world's largest coffee producer, followed by Colombia and Vietnam. Among natural commodities, coffee has a monetary value surpassed only by oil. Its international trade generates over US\$ 90,000 million each year and involves about 500 million people in its management, from cultivation to the final product for consumption. (DaMatta and Ramalho, 2006). The coffee tissue is notoriously recalcitrant to common protein extraction methods due to high levels of interfering compounds, mainly (poly)phenols. Phenolic compounds reversibly combine with the proteins by hydrogen bonding and irreversibly by oxidation followed by covalent condensations (Loomis e Bataille, 1966), leading to charge heterogeneity and streaks in the gels. Most problems can be traced to co-extraction of non-proteic cellular components that can affect protein migrations (Görg, *et al.* 2000).

This study focuses on the specific problems of protein extraction from coffee, an extremely difficult plant that presents many non-proteic contaminants. The aim of our study was to enhance the resolution of 2-DE of leaf and root coffee proteins, by improving the protein extraction procedure, in order to have more spots for identification of protein by the mass spectrometry.

Materials and methods

Plant material

Plants of *Coffea canephora* Pierre var. *kouillou* were obtained from the Institute for Research and Rural Assistance of Espírito Santo State (INCAPER), Brazil. The plants were grown under green-house conditions in Viçosa (20°45' S, 650 m a.s.l.), southeastern Brazil in pots of 12 liters containing a mixture of soil, sand and hardened manure (3:1:1, v/v/v). The walls of the green house consisted of coarse mesh screen, which permitted free exchange of air with the external environment. When plants were six-months-old, leaves from the third or fourth pair of plagiotrophic branches from the apex and roots were collected, grounded in liquid N₂ and stored at -80°C or used immediately for extraction.

Protein extraction protocols for coffee leaves and roots

All operations were made at 4°C and gloves were strictly used throughout to avoid contamination from human keratins. Protein concentrations were determined according to Bradford (1976), by using BSA as the standard protein.

1. Protein extraction based on TCA/acetone precipitation

TCA precipitation was based on the work of Damerval *et al.* (1986) with some modifications. Briefly, coffee leaves and roots were ground in a pre-cooled mortar in the presence of liquid nitrogen. The powdered tissue (1.5 g) was resuspended and precipitated overnight with 10% TCA (trichloroacetic acid) in acetone (1mL acetone/0.1g powdered tissue). Proteins were allowed to precipitate for 1 h at -20°C. After centrifugation at 35,000 g for 15 min at 4°C, the supernatant was removed and the pellet was rinsed twice in ice-cold acetone (1mL acetone/0.1g powdered tissue). The pellet was lyophilized, resuspended in 1ml of sample buffer the 2-DE (8 M urea, 4% CHAPS, 2% IPG-buffer (Amersham Biosciences), 80mM DTT, 2% Bromophenol blue), and sonicated three times for 1 min at 4°C.

2. Protein extraction based on TCA precipitation and phenol extraction followed by methanol/ammonium acetate precipitation

This method was based on the protocol described by Wang *et al.* (2003) with some modifications. Coffee leaves and roots were grounded in a pre-cooled mortar in the presence of liquid nitrogen. The powdered tissue (1.5 g) was resuspended and precipitated with ice-cold acetone (1mL acetone/0.1g powdered tissue) for 2 h at -20°C. After centrifugation at 10,000 g for 5 min at 4°C, the supernatant was discarded and the pellet was rinsed five times in ice-cold acetone (1mL acetone/0.1g powdered tissue). The pellet was lyophilized. The dried powder was grounded further to a finer powder by the aid of quartz sand and then transferred into new centrifuge tubes. The fine powder was sequentially rinsed with cold 10% TCA (1mL TCA solution/0.1g powdered tissue) for 3–4 times or until the supernatant was colorless, then rinsed twice with cold aqueous 10% TCA, and finally rinsed twice with cold 80% acetone (1mL acetone/0.1g powdered tissue). After each washing the pellet was resuspended and then centrifuged as mentioned above. The final pellet was dried, lyophilized and immediately used for

protein extraction, or stored at -80°C until use. About 0.05–0.1 g of the dry powder of leaf tissue was resuspended in 0.8 mL phenol (Tris-buffered, pH 8.0; Sigma St. Louis, MO, USA) and 0.8 mL of dense SDS buffer (30% sucrose, 2% SDS, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0) in a new centrifuge tube. The mixture was vortexed thoroughly for 30 s and the phenol phase was separated by centrifugation at 10,000g for 5 min. The clear upper phenol phase was collected to fresh tubes. At least 5 volumes of 0.1M cold methanolic ammonium acetate were added to the phenol phase and the mixture was precipitated overnight at -20°C. Precipitated proteins were recovered by centrifugation at 10,000 g for 5 min, and then washed twice with 0.1M cold methanolic ammonium acetate and twice with cold 80% acetone. The final pellet was dried and resuspended in 1mL of 2-DE sample buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 2% IPG-buffer Amersham Biosciences, 80mM DTT, 2% Bromophenol blue), and sonicated three times for 1 min at 4°C.

3. Protein extraction based on phenol extraction followed by methanol/ammonium acetate precipitation

Phenol extraction of protein is based in the second part of the protocol described by Wang *et al.* (2003) with some modifications. Coffee leaves and roots were grounded in a mortar in the presence of liquid nitrogen. The powdered tissue (1.5 g) was resuspended in equal volume of phenol (Tris-buffered, pH 8.0; Sigma St. Louis, MO, USA) and dense SDS buffer (30% sucrose, 2% SDS, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0). About 0.05-0.1g of dry powder was resuspended in 0.8ml of phenol plus 0.8ml of dense SDS buffer followed by vortexing for 30 min at 4°C. After centrifugation (15 min, 5,000 g, 4°C) the phenolic phase was collected and precipitated overnight at -20°C with five volumes of 100 mM ammonium acetate in methanol. Precipitated proteins were recovered at 5,000 g for 15 min, and then washed with cold methanolic ammonium acetate twice and cold 80% acetone twice. The final pellet was dried and dissolved in 1 ml of sample buffer of 2-DE (8 M urea, 4% CHAPS, 2% IPG-buffer Amersham Biosciences, 80 mM DTT, 2% Bromophenol blue), and sonicated three times for 1 min at 4°C.

SDS-PAGE and 2-DE

One dimension SDS-PAGE analysis was carried according to Laemmli (1970). The solubilized proteins (40 µg protein *per* lane) after denaturation at 95°C for 5 min,

were resolved in SDS-PAGE in 12% acrylamide gels. The gels were stained with Coomassie Blue R-250.

In the 2-DE, the first dimension or isoelectric focusing (IEF) was performed in strips of 18 cm and pH 4–7 (GE - Amersham Biosciences) rehydrated for 14–20 h in 500 μ L re-hydration buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 0.002% bromophenol blue, 2% IPG-buffer, 0.2% DTT). The protein sample (1mg) was applied in the cup loading. IEF was carried out on the Multiphor II (Amersham Biosciences) at 20°C: 1min at 500 V, 30 min at 1500 V and 9 h at 3000 V. Prior to second dimension analysis, the individual strips were equilibrated for 15 min in 10 mL equilibration solution (6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue, 50mM Tris pH 8.8) containing 100 mg DTT. The separation in the second dimension was performed on the PROTEAN II Ready Gel System (BioRad) with lab cast 1.5 mm in SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels. The electrophoresis conditions were 15 min 15mA/gel, 7 h 30mA/gel.

Protein visualization and image analysis

The protein spots in preparative gels were visualized by silver nitrate carried on according to optimized silver staining of Ettan DALT gels (according to the protocol of the manufacturer).

Analytical gels were stained with colloidal Coomassie blue. Gels were fixed three times with 2% phosphoric acid and 30% ethanol for 30 min, then rinsed three times in 2% phosphoric acid for 20 min, and incubated in 18% ethanol, 15% ammonium sulphate and 2% phosphoric acid for 30 min. Gels were stained with 0.02% colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 for 72 h. Finally, the gels were stored in a 1% acetic acid solution before digitalization. Stained gels were scanned and calibrated with labscan 5 software (Amersham Biosciences). Image analysis was performed with ImageMaster 2-D platinum (Amersham Biosciences). Spot detection and matching by ImageMaster were checked and edited manually when necessary.

Protein identification

Protein spots were manually excised from 2-DE gels that had been stained with colloidal Coomassie blue. Excised spots were transferred to centrifuge tubes of 0.6 mL and digested with 20ng/ μ L trypsin. The proteolysis was carried through in two steps.

The first digestion was performed according to protocol of digestion in microwaves (Sun *et al.* 2006). The second digestion was carried out in the pieces of gels after a new addition of 20ng/μL trypsin, at 37°C overnight. The digested peptide fragments were analyzed over the mass range of 800–3500 Da in a Maldi-TOF-TOF (4700 Proteomics Analyser, Applied Biosystems) Version 3.0 software, in the MS or in the MS/MS way. From the 5 more intense peaks it was possible to generate data for protein identification by Peptide Mass Fingerprinting (PMF) and/or by MS/MS Ion Score using the algorithm MASCOT4. The identifications created were confirmed using the SCAFFOLD and/or PEAKS softwares.

Results and discussion

Evaluation of methods for protein extraction of coffee leaves

The quality of protein extraction obtained using the three protocols was monitored by both one dimension SDS-PAGE and 2-DE and both experiments were repeated at least three times to confirm reproducibility.

The three protocols were evaluated: protocol 1 - Protein extraction based on TCA in acetone precipitation; protocol 2 - Protein extraction based on TCA precipitation and phenol extraction followed by methanol/ammonium acetate precipitation and protocol 3 - Protein extraction based on phenol extraction followed by methanol/ammonium acetate precipitation (Figure 1). Our main modifications on the three protocols compared with the original ones (Damerval *et al.*, 1986; Wang *et al.* 2003) were the increase of the number of washings to minimize the quantities of interferences on the subsequent steps and sonicate the samples at the end of the extraction to maximize the solubilization of the proteins extracted in solution.

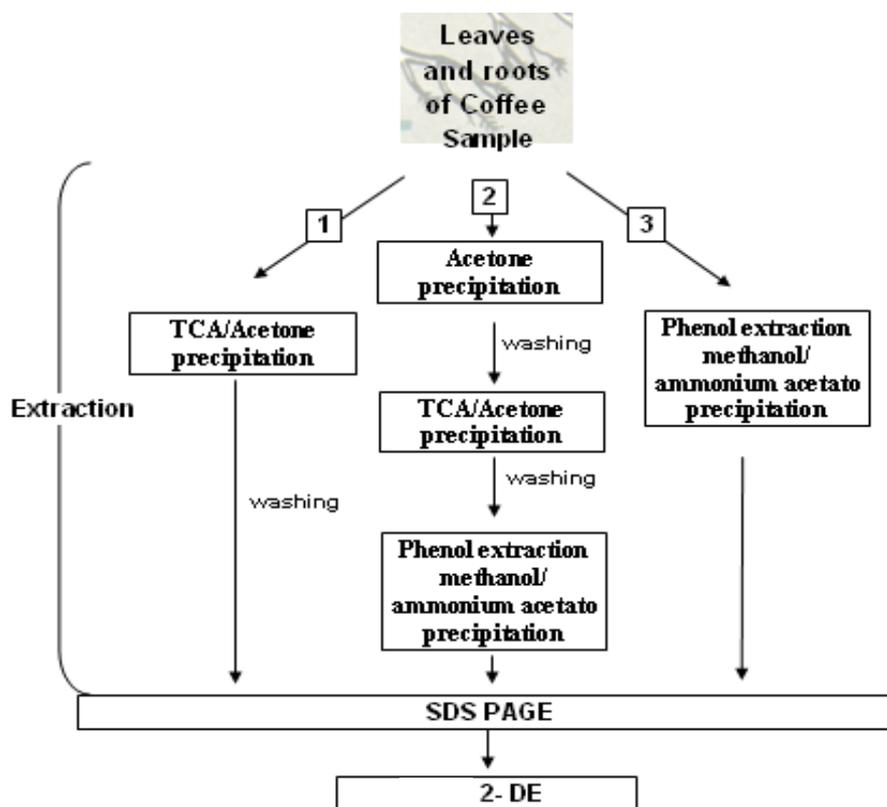


Figure 1: Schematic outline of the three protein extraction protocols used in this study.

One efficient extraction of proteins from a tissue sample depends on the quality of the sample disruption. When proteins are extracted by directly homogenizing coffee leaf and root in aqueous buffers and then precipitated by organic solvents, polyphenols and other contaminants will co-purify with the proteins. This results in a brownish pellet, due to polyphenolic oxidation, that is hard to be dissolved and is not suitable for 2-DE (our observations). In the three protocols tested, the plant tissues were pulverized to a fine powder in a mortar and pestle under liquid nitrogen to minimize proteolysis and other modes of protein degradation. In the protocols 1 and 2, the combination of TCA and acetone is used to precipitate proteins and remove contaminants during preparation for 2-DE besides eliminating instantly proteolytic activity and other modifying enzymes (Wu *et al.*, 1984). Only the precipitation with TCA in acetone as protocol 1 did not appear to be effective on the extraction of proteins from coffee leaves (Figure 2, lane 3). This protocol resulted in the extraction of only proteins with molecular weight lower than 45 kDa which are not representative of total protein population. This fact is probably due to the high degree of interferents, mainly (poly) phenols that affect the solubility of proteins making possible the existence of a high degree of precipitation. After the precipitation, the pellet is no longer soluble.

Furthermore, in protocol 1 the sample appeared as it had been spread out laterally, typical behavior of sample contaminated with non-protein compounds (Figure 1, lane 3). This pattern of race was always observed. The SDS-PAGE was repeated at least three times to confirm reproducibility.

In contrast, the protocol 2 was more effective on the protein extraction (Figure 2, lane 1). It did not cause the typical drags of protein degradation and the larger subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco) appears in a very prominent form excelling the other proteins (Figure 1, arrow). Rubisco can comprise more than half of total leaf protein in some species, and so its presence during electrophoresis of leaf proteins substantially reduces the number of detectable protein spots. The largest subunit of Rubisco can be used as a guide of efficient leaf extraction (Figure 2, arrow), because it represents the most abundant protein present in photosynthetic green tissues. The protocol 2 promoted the extraction of a greater group of protein that goes from high molecular mass to the smallest molecular mass seen by the gel resolution (Figure 2, lane 1). That protocol also appeared to be efficient for protein extraction from olive leaves, another species that also has a high level of interferents (Wang *et al.* 2003).

The protein profile of extraction by the protocol 3 (Figure 2, lane 2) did not show the band corresponding to Rubisco, indicating that the protein extracted do not represents total protein population.

TCA in acetone is a classical very effective precipitant (Damerval, et al. 1986), eliminating instantly proteolytic and other modifying enzymes (Wu and Wang, 1984). However, a disadvantage of TCA precipitated proteins is that they are difficult to dissolve (Nandakumar et al. 2003). Protocol 1 is a simple protocol that presents few steps of pellet washing as compared to the other protocols. In species with high quantity of non-protein interferents such as coffee plants the modifications we added to protocol 1, such as increase of number and volume of washings and sonication of the sample at the end the protocol did not appear to be effective.

In the protocol 2, such as in the protocol 3, sucrose is added to the phenol extraction buffer to create a phase inversion. After centrifugation, two phases were formed, the aqueous lower phase containing carbohydrates, nucleic acids and insoluble cell debris; the upper phenol rich phase that contains cytosolic and membrane proteins, lipids and pigments. The high pH in the phenol buffer (pH 8) inhibits most common proteases (Hochstrasser et al. 1988), ensures that the abundant phenolic compounds are mainly ionized (inhibiting H bonding with the proteins) (Loomis e Bataille, 1966) and neutralizes acids that are released by disrupted vacuoles. DTT (1,4-Dithiothreitol) is a

powerful reducing agent that does not actually prevent the oxidation of plant (poly)phenols (quinones) but reduces them to form thio-esters (Loomis e Bataille, 1966). We did not use protease inhibitor cocktails in the extraction buffer because the proteases are supposed to be irreversibly inactivated after phenol extraction and precipitation as is the case with TCA precipitation.

Protocol 2 presents before the phenol extraction some steps of precipitation and washings with acetone and TCA in acetone that cause the removal of a great part of the interferents from the sample. In the protocol 3, the phenol extraction by itself was not enough to removal the interferents.

The efficiency of coffee leaf protein extraction with the protocol 2 was about 6.4 μg protein/mg tissue fresh weight. Such value was compatible with values found in the literature for other plant species; 7 μg protein/mg fresh weight tomatoes leaves (*Lycopersicon esculentum*) (Saravanan and Rose, 2004), 9 μg protein/mg fresh weight banana leaf (*Musa ssp.*) (Carpentier *et al.* 2005).

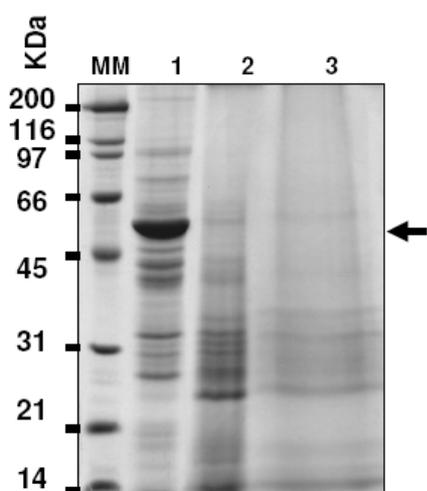


Figure 2. Evaluation of coffee leaf protein obtained from different extraction methods. Lanes: MM; Ladder, 1- protocol 2, protein extracted with TCA/acetone precipitation and phenol extraction methanol/ammonium acetate precipitation protocol;, 2- protocol 3, protein extraction based phenol extraction with methanol/ammonium acetate precipitation; and 3- protocol 1, protein extracted with TCA precipitation. In each lane 40 μg of total protein was applied on a 12%SDS-PAGE gel that was stained with Comassie blue R-250.

Evaluation of methods for protein extraction from coffee root

Root is a difficult tissue to macerate and possesses low protein content. It presents many non-protein contaminants for the 2-DE electrophoresis, specially the carbohydrates. It is known that carbohydrates can block gel pores causing precipitation and extended focusing times, resulting in streaking and loss of quality of protein extracts. Also terpenoids, pigments, lipids, and wax-like lipid polymers produce streaking and charge heterogeneity.

In the evaluation of methods for protein extraction of coffee root it was tested the same three protocols used for protein extraction from leaves (see methodology). The protocol 1, protein extraction based on TCA in acetone precipitation, shows to be less efficient for extraction of roots proteins (Figure 3, lane 1). This protocol did not eliminate interferents, that may difficult appropriated protein quantification in the sample. Protocol 2, that associate the precipitation of proteins with TCA in acetone precipitation with phenol extraction methanol/ammonium acetate precipitation protocol, appears to be much more effective for extraction of roots proteins (Figure 3, lane 3).

The protocol 3, phenol extraction with methanol/ammonium acetate precipitation, was the least effective for roots protein extraction, as it produced a dark pellet after dilution in IEF buffer and protein bands was not visualized by SDS-PAGE (data not shown). Because of this result and the fact root sample have less phenolic interferents than leaf samples, it was decided to include in protocol 3, a first step of sample precipitation with TCA in acetone. This adaptation resulted in a more efficient protein extraction (Figure 3, lane 2). The efficiency of this protocol was higher than protocol 2 (compare lines 2 and 3). The modified protocols 2 and 3, inclusion of washing steps and precipitation in TCA in acetone, were the most efficient in the extraction of total coffee root protein. The efficiency of coffee root protein extraction with the modified protocol 3 was about 4 mg protein/mg fresh weight. For the protocol 2 it was not possible to calculate the nearest quantity of proteins for extraction due to the high variation of concentration in different extractions.

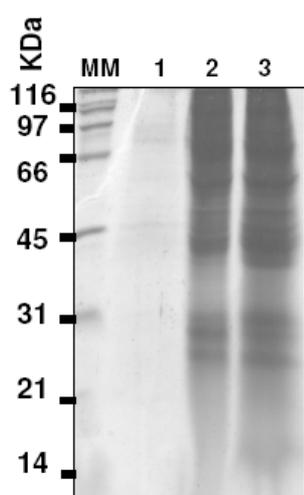


Figure 3. Evaluation of coffee root protein obtained from different extraction methods. Lanes: MM;_Ladder Lane, 1_ protocol 1, protein extracted with TCA/acetone protocol; Lane 2_ protocol 3 modified, protein extracted with TCA precipitation and phenol extraction methanol/ammonium acetate precipitation protocol; and lane 3_protocol 2, protein extracted with TCA precipitation and phenol extraction methanol/ammonium acetate precipitation protocol. In each lane 40 μ g of total protein was applied on a 12%SDS-PAGE gel that was stained with Comassie blue R-250.

Evaluation of methods for coffee leaf protein extraction by 2-DE

The leaf protein extracts obtained using the protocol 2 were analyzed by 2-DE gels. Due to the low quality of protein extract obtained through protocols 1 and 3 (Figure 2), these extracts were discarded from further 2-DE analysis. Total protein extracted by protocol 2 and resolved by 2-DE (Figure 4) produced well-resolved polypeptide spots throughout the gel with little streaking. The 2-DE gels were stained with colloidal Coomassie blue and presented about 950 spots. The gels appeared to be reproducible and of high quality, absence of vertical streaking, smearing and reduction in the number of distinctly resolved protein spots.

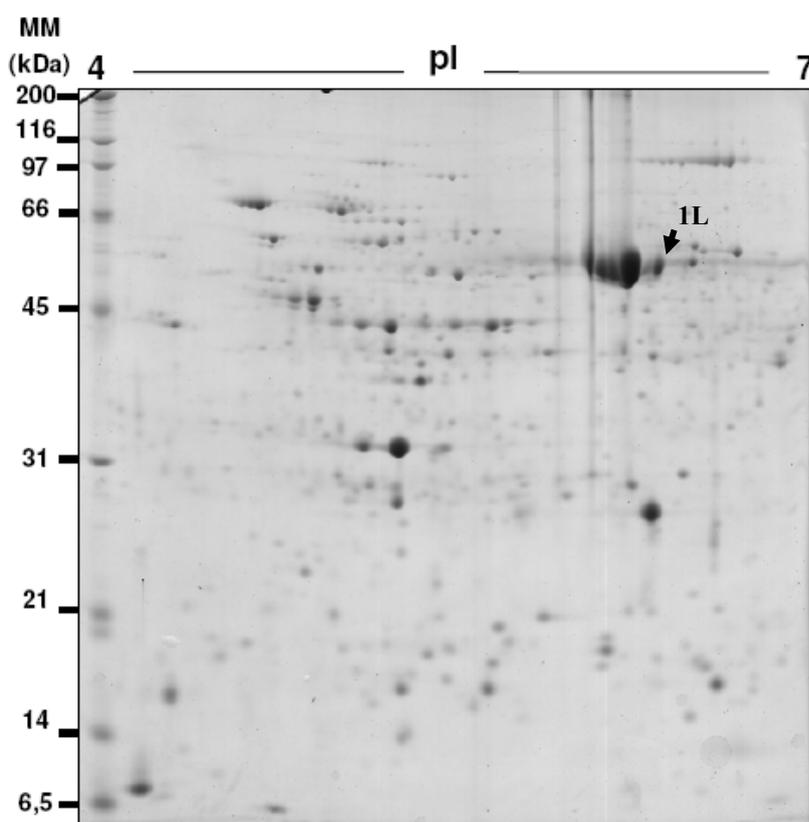


Figure 4. 2-DE analysis of proteins from coffee leaf extracted by protocol 2. Proteins were separated on a 4–7 linear pH gradient in the first dimension and second dimension in 12% acrylamide gels and visualized using colloidal Coomassie staining. The black arrow (1L) indicates protein that was subsequently identified by MS/MS and is listed in Table 1.

Evaluation of methods for coffee root protein extraction by 2-DE

Root protein extracts obtained by modified methods 2 and 3 were analyzed by 2-DE. Due to the low quality of protein extract obtained by method 1 (Figure 3, lane 1), this extract was discarded from further 2-DE analysis. The 2-DE gels containing protocol 2-obtained proteins showed a low resolution as compared to protocol 3 with a few spots in all pH range of the gel (Figure 5).

2-DE gels of proteins obtained through modified protocol 3 showed a higher number of individualized spots (around 750 spots) and absence of contaminants smear (Figures 5b and 6). An important observation is that the pellet of root protein extraction should be a pellet in fine grains that does not adhere to the bottom of the tube as the pellet of leaf extraction. After the washings there is a prominent loss of protein during the supernatant removal due to the granular and not adhering nature of the root extraction. The higher efficiency observed in the modified protocol 3 may be due to the abolishment of some washing steps, and hence the decrease in the protein pellet losses.

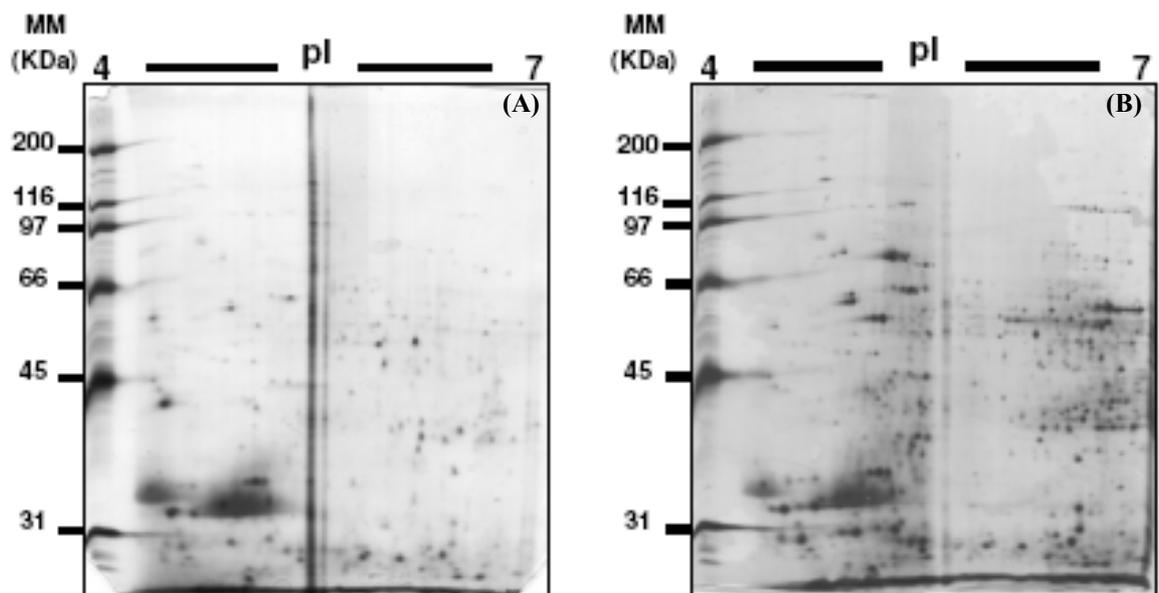


Figure 5. 2-DE analysis of proteins from coffee root extracted by modified protocol 2 (A) and 3 (B). Proteins were separated on a 4–7 linear pH gradient in the first dimension and second dimension on 12% acrylamide gels and visualized using silver staining.

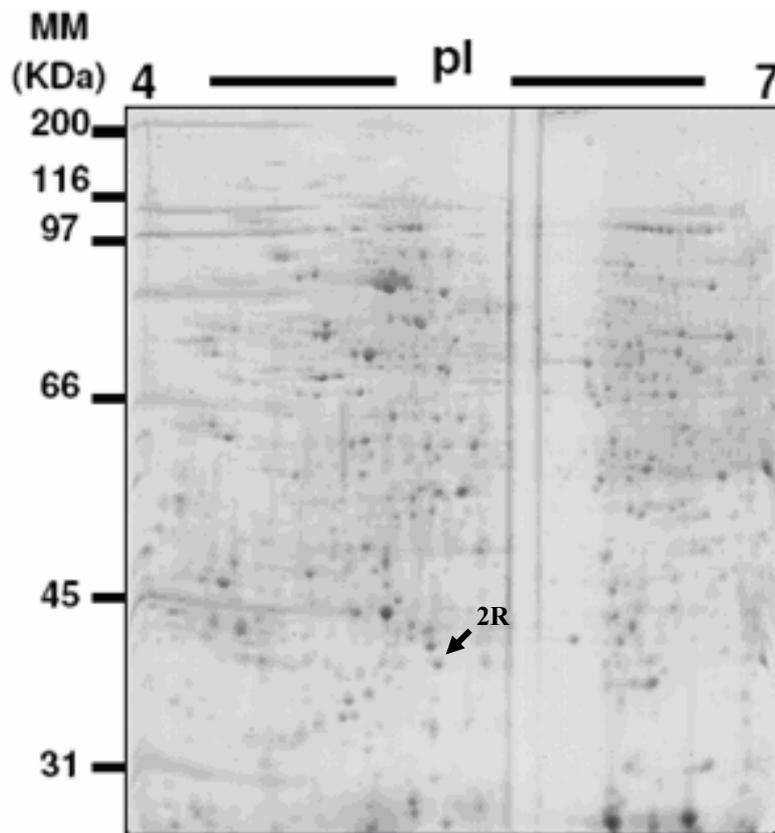


Figure 6. 2-DE analysis of proteins from coffee root extracted using protocol 3 modified. Proteins were separated on a 4–7 linear pH gradient in the first dimension and second dimension in 12% acrylamide gels and visualized using colloidal Coomassie blue staining. The black arrow (2R) indicates protein that was subsequently identified by MS/MS and is listed in Table 1.

Protein identification

After the choice of the protocols that resulted in the best protein profile in addition to a separation free of tracks in the gel 2-DE, we picked one spot from leaf and one from root 2-DE gels for identification by MS/MS (Figures 4 and 6, black arrows). These spots identified the Rubisco protein in the gel from the leaf extract and high molecular weight heat shock protein in the gel from root (Table 1). Other spots were also retrieved and the proteins identified (data not shown). This analysis allows us to conclude that the protocols chosen for the extraction of leaf and root protein are also compatible with the identification of protein by mass spectrometry.

Table 1. Identity of proteins from leaf and root coffee obtained by mass spectrometry.

Spot	Obs/Pre Mass (kDa)	Obs/Pre pI	Protein Score (C.I.%)	Genbank Accession	Homologous protein	Species
1L	57/52	6.5/5.9	100	gi11230404	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit	<i>Coffea sp.</i>
2R	27/71	5.4/5.2	100	gi16969976	High molecular weight heat shock protein	<i>Malus domestica</i>

The observed (Obs) and predicted (Pre) Mass and pI values are shown.

Conclusions

In the last few years, substantial improvements in protein separation and identification techniques and the expansion of genomic knowledge have led to an increase in the application of proteomic methods to answer biological questions. The most popular technique for protein separation is currently two-dimensional gel electrophoresis. The protein extraction method adjusted here is useful for guiding the experimental setup of coffee and many other non-model species, containing various interfering elements.

We tested several protocols for extraction of coffee leaf and root proteins. The TCA precipitation and phenol extraction methanol/ammonium acetate precipitation protocol (protocol 2) stands out on both tissues minimizing the presence of interferents. However, for the root protein extraction the modified protocol 3 was the most effective allowing a better extraction in less time and with a decrease in protein losses during the initial washings. We believe that the procedures described here will provide a novel opportunity for preparing 2-DE reference maps and protein identification from coffee tissues. This study will also make possible future studies aiming coffee proteins identification by the 2-DE gel in stress treatments specially water stress.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Richard Hemmi Valente from the Toxinology Laboratory of FIOCRUZ– RJ (Fundação Oswaldo Cruz), Dr. Paolo DiMascio and Izaura N. Toma from Chemistry Institute, Universidade de São Paulo (USP), Brazil, for the assistance in mass spectrometry analysis. This study was supported by the Consórcio Brasileiro de Pesquisa do Café, CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa).

References

- Amersham Biosciences** 2-D Electrophoresis using Immobilized pH Gradients: Principles and Methods, code number 80-6429-60, 1998.
- Bradford M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248–254, 1976.
- Carpentier S.C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R., Panis B.** Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis *Proteomics* 5:2497–2507, 2005.
- Celis J.E., Ostergaard, M., Jensen N.A., Gromova I., Rasmussen H.H. Gromov P.** Human and mouse proteomic databases: novel resources in the protein universe. *FEBS Lett.* 430:64-72, 1998.
- DaMatta F.M. and Ramalho J.D.C.** Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review *Braz. J. Plant Physiol.*, 18:55-81, 2006.
- Damerval C., deVienne D., Zivy M., Thiellement H.** Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7:52–54, 1986.
- Gobom J., Schuerenberg M., Mueller M., Theiss D., Lehrach H., Nordhoff E.** α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI/MS peptide analysis in proteomics. *Anal Chem* 73:434-438, 2001.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R. and Weiss W.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21:1037–1053, 2000.
- Granier F.** Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 9:712–718, 1988.
- Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y. and Aebersold R.** Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9390-9395, 2000.
- Hochstrasser D.F., Harrington M.G., Hochstrasser A.C., Miller M.J., Merrill C.R.** Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal Biochem.* 173: 424–435, 1988.

- Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685, 1970.
- Loomis W.D. and Bataille J.** Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem.* 5:423–438, 1966.
- Nandakumar M.P., Shen J., Raman B., Marten M.R.** Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Res.* 2:89–93, 2003.
- Nordhoff E., Egelhofer V., Giavalisco P., Eickhoff H., Horn M., Przewieslik T., Theiss D., Schneider U., Lehrach H. and Gobom J.** Large-gel two-dimensional electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry: an analytical challenge for studying complex protein mixtures. *Electrophoresis* 22:2844-2855, 2001.
- Saravanan R.S. e Rose J.K.C.** A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues *Proteomics* 4:2522–2532, 2004.
- Van Wijk K.J.** Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology*, 126: 501-8, 2001
- Wang W., Scali M., Vignani R., Spadafora A., Sensi E., Mazzuca S., Cresti M.** Protein for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* 24:2369-2375, 2003.
- Wu F.S., Wang M.Y.** Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues. *Anal. Biochem.* 139:100–103, 1984.

Capítulo II

Proteínas diferencialmente expressas em genótipos contrastantes de *Coffea canephora* submetidos a condições de *déficit* hídrico

Guimarães, B.L.S.^{1*}; Silva, V.A.¹; Valente, R.H.²; Loureiro, M.E.¹; Baracat-Pereira, M.C.³;
Fontes, E.P.B.³; Almeida, A.M.^{1*}

1-Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG,
Brasil;

2- Laboratório de Toxinologia, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ– RJ);

3-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/BIOAGRO, Universidade Federal de
Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil.

*Autor correspondente: amalmeida@ufv.br

Resumo

Neste trabalho, foram verificados parâmetros fisiológicos da resposta de clones de *Coffea canephora* do grupo conilon ao *déficit* hídrico e identificadas proteínas com expressão diferencial sob este estresse. Mudas dos clones 120 (genótipo tolerante) e 109A (genótipo sensível ao *déficit* hídrico) foram cultivadas em vasos de 12 L e o *déficit* hídrico foi alcançado suspendendo-se a irrigação até que os clones tratados atingissem um potencial hídrico de antemã de -3,0 MPa. O *déficit* hídrico promoveu reduções na taxa de assimilação líquida de CO₂ em todos os clones estudados, sendo tais reduções acompanhadas pela redução da condutância estomática. Foi observado um aumento mais pronunciado no extravasamento de eletrólitos, assim como na atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidativo no clone sensível ao *déficit* hídrico (109A), principalmente na atividade da enzima ascorbato peroxidase e da enzima catalase. Foi observado aumento na expressão de alguns chaperones moleculares e de algumas proteínas dos fotossistemas, e a maior expressão de algumas isoformas da subunidade maior da Rubisco, o que pode contribuir para a manutenção do papel antioxidativo da fotorrespiração. O fato de que somente no clone tolerante, na presença do estresse, houve maior acumulação de uma NADPH-quinona redutase, e a manutenção da abundância da glutamina sintase, sugerem que a primeira enzima pode ter importante papel no mecanismo antioxidativo associado à tolerância à seca neste clone, bem como a importância da manutenção da assimilação da amônia e da fotorrespiração nestas condições. Estes dados sugerem que a provável maior fotorrespiração no clone tolerante possa também ter uma contribuição na tolerância ao *déficit* hídrico.

Palavras-chave: *Coffea canephora*, *déficit* hídrico, espectrometria de massa e proteoma.

Introdução

A produção de café pode diminuir em mais de 80% em anos secos em algumas regiões marginais àquelas ótimas para a sua maior produtividade (DaMatta e Ramalho, 2006). A tolerância à seca é o resultado de numerosas características anatômicas, morfológicas e fisiológicas, de natureza constitutiva ou indutiva, que co-agem, permitindo assim a manutenção de processos de crescimento e desenvolvimento sob condições edáficas e climáticas que levam à deficiência hídrica (Steponkus *et al.*, 1980). Desta forma, é esperado que vários mecanismos sejam responsáveis pela tolerância salientando a necessidade de que sejam identificadas as proteínas que regulam estas diferentes respostas que conferem à tolerância no café.

Mais de 90 espécies do gênero *Coffea* foram identificadas, porém, somente duas, *Coffea canephora* Pierre e *Coffea arabica* L., têm importância econômica. A espécie *C. canephora* apresenta dois grupos distintos, em função da região de ocorrência: o grupo denominado *kouillou* (ou conilon) e o grupo robusto. Plantas do grupo robusta são caracterizadas por um vigoroso sistema radicular, o que lhe confere alta capacidade de absorção da água do solo (Alfonsi *et al.*, 2005). Entretanto, tais plantas parecem apresentar um controle estomático deficiente da transpiração (Fahl *et al.*, 2001), o que concorreria para uma rápida exaustão da água do solo e, conseqüentemente, baixa tolerância à seca. Por outro lado, em conilon parece haver um controle estomático da transpiração mais eficiente relativamente que em robusta, apesar do grande polimorfismo observado em diferentes clones deste grupo no que diz respeito à tolerância à seca (DaMatta e Rena 2001; DaMatta, 2004; DaMatta e Ramalho, 2006). O *C. canephora*, apesar de fornecer uma bebida de qualidade inferior àquela fornecida por grãos de café arábica, possui uma produtividade crescente no Brasil e no mundo. Os estados do Espírito Santo, Acre e Rondônia são os maiores produtores brasileiros de *C. canephora*, conferindo ao Brasil a posição de maior exportador do mundo, principalmente quanto à exportação de café solúvel (Silva e Leite, 2000). Ademais, *C. canephora* é mais indicado para regiões de baixa altitude com temperaturas médias anuais elevadas (de 22°C a 26°C) e dentre certos limites, a regiões com um período seco mais prolongado, pois em geral, clones de *C. canephora* apresentam maior tolerância ao *déficit* hídrico se comparado a genótipos de café arábica (Fazuoli, 1986).

Nos últimos anos, a maior parte das lavouras de *C. canephora* vem sendo formada a partir de mudas clonais selecionadas de matrizes muitas vezes cultivadas sob irrigação. Os clones assim obtidos, uma vez conduzidos com restrição hídrica, exibem grande

variabilidade quanto à tolerância à seca (Da Matta *et al.*, 1997; Da Matta *et al.*, 2000; DaMatta *et al.*, 2003). O desempenho de 500 clones de café canéfora do grupo conilon foi analisado em campo, considerando-se principalmente a produtividade média sob condições ótimas de irrigação e sob condições não-irrigadas (Ferrão *et al.*, 2000a, b). Uma grande variabilidade na produtividade média dos clones foi observada, destacando-se como mais tolerantes os clones 120, 74, 75, 01, dentre outros, cujas produtividades médias mostraram-se praticamente inalteradas mesmo sob condições de seca. De modo oposto, clones considerados sensíveis (143, 109A, 80, 46) apresentaram produtividades médias reduzidas em mais de 50%, quando cultivados sem irrigação. A partir desses estudos, Da Matta *et al.* (2000) selecionaram quatro clones (14, 120, 46 e 201), com respostas contrastantes quanto à tolerância ao *déficit* hídrico e mostraram que alguns clones considerados tolerantes apresentaram alta eficiência do uso da água, enquanto outros mantiveram a condutância estomática, mesmo sob potencial hídrico (Ψ_w) de antemã menor que $-2,5$ MPa, considerado um potencial estressante. Nesses clones, é possível que haja uma deficiência e/ou uma diferença na sensibilidade estomática aos níveis de ácido abscísico (ABA) no controle estomático, permitindo que ocorra assimilação líquida do carbono, ainda que às expensas da perda de água. Aparentemente a manutenção da condutância estomática a baixos Ψ_w pode ser um reflexo de reduzidos níveis foliares de ABA (Silva, V.A e Loureiro, M.E., comunicação pessoal).

Lima *et al.* (2002) observaram que um clone de *C. canephora* do grupo conilon tolerante à seca (clone 120) apresentou uma maior atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante que o clone sensível (clone 109A). Foram observados incrementos muito maiores nas atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) no clone 120 após submetê-lo ao *déficit* hídrico (potencial hídrico de antemã, Ψ_{pd} , de $-3,0$ MPa). Além disso, esse clone apresentou menores níveis de peroxidação de lipídios e extravasamento de eletrólitos que o clone 109A. Em conjunto, estes dados sugerem que atuação diferencial do mecanismo antioxidativo possa ser um dos atributos que conferem maior tolerância à seca.

O projeto de melhoramento da INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), associado ao trabalho de caracterização fisiológica realizada pelo grupo de Fisiologia Vegetal da UFV, tem caracterizado em detalhes as diferenças fisiológicas associadas à maior susceptibilidade e à maior tolerância dos clones 109 e 120 de *Coffea canephora*, respectivamente. O presente trabalho continua esta mesma linha de pesquisa, objetivando identificar em nível do proteoma, os

possíveis mecanismos de adaptação ao estresse hídrico nestes dois genótipos com respostas contrastantes a este estresse.

Materiais e Métodos

Material Vegetal e delineamento experimental:

Foram utilizados dois clones de *Coffea canephora* do grupo conilon: clone 109A, sensível ao *déficit* hídrico; e clone 120, tolerante ao *déficit* hídrico (Lima *et al.*, 2002). As mudas foram gentilmente cedidas pelo Instituto Capixaba de Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER. Mudas com 6 meses de idade foram plantadas em vasos de 12 L, preenchidos com uma mistura composta de solo, esterco de curral curtido e areia, na proporção de 3:1:1 (v/v). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, com irrigação contínua e sob irradiação média ao meio-dia em torno de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Ao atingirem 10 meses de idade, mudas com características de crescimento similares foram selecionadas para o experimento. Estas plantas foram então avaliadas em condições de plena irrigação (controle); sob deficiência hídrica, imposta pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingiram um potencial hídrico de antemanhã (Ψ_w) de aproximadamente -3 MPa (*déficit* hídrico). O delineamento experimental foi ao acaso, com quatro tratamentos e cinco repetições, formando um esquema em fatorial 2×2 (dois clones, dois regimes hídricos e cinco repetições). Os resultados foram avaliados pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

Caracterização das respostas fisiológicas

Ambos os clones, durante o experimento de estresse hídrico, tiveram as seguintes variáveis determinadas.

Potencial hídrico da folha – foi determinado em folhas completamente expandidas, por meio de uma bomba de pressão do tipo Scholander, na antemanhã e ao meio-dia, conforme descrito por Da Matta *et al.* (1997).

Taxa de assimilação líquida de carbono – foi medida em sistema aberto, sob luz saturante, por volta das 8:00 h, com um analisador de gases a infravermelho portátil

(LCA-4, ADC, Hoddesdon, Reino Unido), sob irradiância saturante e CO₂ ambiente, conforme descrito anteriormente (Da Matta *et al.*, 1997).

Variáveis de fluorescência – a eficiência fotoquímica do fotossistema II foi estimada à temperatura ambiente, em folhas adaptadas a 30 min de obscuridade, por meio da razão entre fluorescência variável e máxima (F_v/F_m) medidas com um fluorômetro (PEA, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). A indução da emissão de fluorescência foi efetuada com um pulso saturante de 3 mmol fótons m⁻² s⁻¹, com picos de comprimento de onda em 650 nm, por 5s, conforme descrito anteriormente (Da Matta *et al.*, 1997).

Coleta e acondicionamento do material vegetal

As folhas das plantas controle e submetidas ao *déficit* hídrico foram coletadas quando as plantas sob *déficit* hídrico atingiram Ψ_w na antemãnhã de aproximadamente – 3 MPa (*déficit* hídrico), foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio, congeladas sob nitrogênio líquido, e armazenadas a –80°C.

Ensaio enzimáticos

Foram determinadas as atividades de algumas enzimas do sistema antioxidante: superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). As enzimas foram extraídas utilizando-se almofariz e pistilo pré-resfriados, com polivinilpolipirrolidona (PVPP) 200 % (p/p) e 4 mL de meio de extração específico para cada enzima, como se segue: SOD [tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, DTT 1mM, β-mercaptoetanol 10 mM e Triton X-100 0,1 % (v/v)]; APX [tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM, ascorbato 20 mM e Triton X-100 0,1 % (v/v)]; CAT [tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM, ascorbato 20 mM e Triton X-100 0,1% (v/v)]. O homogeneizado resultante foi centrifugado a 15000 g, por 15 min, a 4° C. O sobrenadante foi coletado e usado para quantificação protéica (Bradford, 1976) e atividades enzimáticas.

A atividade total da SOD foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico, descrito por Giannopolitis e Ries (1977), em que a atividade da SOD é dada pela capacidade da enzima em inibir a redução fotoquímica do azul de nitrotetrazólio (NBT) sob luz. Para os ensaios de atividade, uma alíquota do extrato enzimático (5 µL) foi aplicada a 3 mL (volume final) de meio de reação contendo

tampão fosfato de potássio 52,5 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 μ M, NBT 75 μ M, metionina 13 mM (pH 7,8) e riboflavina 2 μ M. A interferência inespecífica inerente ao extrato adicionado ao ensaio enzimático foi determinada pela adição de extrato desnaturado à mistura de reação, enquanto que a produção total de azul de formazana foi determinada utilizando-se apenas o meio de reação. O ensaio de atividade foi iniciado pela exposição dos tubos contendo as referidas misturas a uma câmara contendo luz fluorescente (15 W), a 25° C, por 10 min. A reação foi paralisada desligando-se a luz, sendo a produção fotoquímica de azul de formazana determinada em espectrofotômetro (Hitachi mod. U-2000, Tóquio, Japão), a 560 nm. Uma mistura de reação mantida sob obscuridade foi utilizada como branco. A atividade da SOD (unidades mL^{-1}) foi proporcional à relação $V/v - 1$, em que V é a variação em absorvância por minuto, sem o extrato enzimático, e v é a variação em absorvância por minuto, com o extrato. Considerou-se que 1 U de SOD corresponde à quantidade da enzima capaz de inibir a redução do NBT em 50%.

A atividade da APX foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981), com algumas modificações. O ensaio enzimático foi realizado em espectrofotômetro, após a adição de 15 μ L de extrato enzimático a 985 μ L de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), ascorbato 0,5 mM e H_2O_2 0,1 mM. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 290 nm, durante 1 min, a 25 °C. Para os cálculos da atividade, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do ascorbato (2,8 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), considerando-se que 1 U de APX corresponde à quantidade da enzima capaz de oxidar 1 μ mol de ascorbato por minuto.

A atividade da CAT foi determinada pelo consumo de H_2O_2 , de acordo com Havir e McHale (1989), com algumas modificações. O ensaio enzimático foi realizado em espectrofotômetro, após a adição de 15 μ L de extrato enzimático a 985 μ L de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e H_2O_2 12,5 mM. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, durante 1 min, a 30 °C. Para os cálculos da atividade, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 (39,4 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), considerando-se que, nas condições de ensaio, 1 U de CAT corresponde à quantidade da enzima capaz de oxidar 1 μ mol de H_2O_2 por minuto.

Danos celulares

Extravasamento de eletrólitos foi avaliado pelo uso de um condutivímetro (Biosystems LTDA, São José dos Pinhais, PR). Discos foliares foram analisados imediatamente após a coleta, conforme descrito anteriormente (Lima *et al.* 2002).

Extração das proteínas de folha de café

Para extração das proteínas de folhas de café foi usado o protocolo de extração fenólica descrito por Wang *et al.* (2003), com modificações. Folhas de café foram pulverizadas em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido. O tecido pulverizado (aproximadamente 1,5 g) foi ressuspenso e precipitado por 2 h a -20°C com acetona gelada (1ml:0,1g). Após centrifugação a 10000 g por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado 5 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. O pó fino foi sequencialmente lavado com TCA 10% em acetona gelada (1ml:0,1g) por 3–4 vezes, depois lavado com TCA 10% (1ml:0,1g) e finalmente com acetona 80% (1ml:0,1g). Em cada lavagem o precipitado foi completamente ressuspenso e centrifugado. O precipitado final foi liofilizado e foi estocado a -80°C para uso posterior. Por volta de 0,05–0,1 g do pó fino foi ressuspenso em 0,8 mL fenol (tampão Tris, pH 8.0; Sigma St. Louis, MO, USA) e 0,8 mL de tampão SDS-denso (sacarose 30%, SDS 2%, Tris-HCl 0,1 M, pH 8.0) em um novo tubo de centrifuga. A mistura foi homogeneizada em vortex por 30 segundos e a fase fenólica foi separada por centrifugação a 10000 g por 5 min. A fase superior fenólica foi pipetada e transferida para outros tubos. À fase fenólica foram adicionados cinco volumes de acetato de amônio 0,1M em metanol para precipitação das proteínas a -20°C por no mínimo 12 h. As proteínas precipitadas foram concentradas por centrifugação a 10000 g por 5 min, e lavadas por duas vezes com acetato de amônio 0,1M em metanol e por fim em duas vezes acetona 80%. O precipitado final foi seco, dissolvido em tampão de amostra para gel bidimensional (uréia 8 M, CHAPS 4%, IPG-buffer 2% (Amersham Biosciences), DTT 80mM, Bromophenol blue 2%), e sonificado por três vezes por 1 minuto no gelo. A concentração protéica foi determinada nas amostras de acordo com o método de Bradford (1976). As amostras foram armazenadas a -20°C.

SDS-PAGE e eletrofores bidimensional (2-DE)

As análises de pureza e integridade da amostra e presença de degradação foram realizadas por SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970). As amostras protéicas foram desnaturadas a 95°C por 5 min e resolvidas por SDS-PAGE a 12% de acrilamida (40 µg

de proteína por linha). Os géis SDS-PAGE foram corados com Coomassie Brillhante blue R-250.

No gel bidimensional, para a primeira dimensão ou focalização isoeétrica (IEF), foram usadas fitas de gradientes de anfolinos imobilizados de 18 cm e pH 4–7 (Amersham Biosciences). As fitas foram reidratadas por 14-20 h em 500µl de tampão de reidratação (uréia 8 M, CHAPS 2%, bromophenol blue 0,002%, IPG-buffer 2%, DTT 0,2%). As amostras (1mg de proteína) foram aplicadas no copo de aplicação. A IEF foi realizada no Multiphor II (Amersham Biosciences) a 20°C: 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 individualmente por 15 min em 10 mL de solução de equilíbrio (uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, bromophenol blue 0,002% , Tris 50mM, pH 8,8) contendo 100 mM de DTT. A separação da segunda dimensão foi realizada no PROTEAN II Ready Gel System (BioRad) com espaçadores de 1.5 mm em gel de poliacrilamida 12%. As condições da eletroforese foram 15 min 15 mA/gel, 7 h 30mA/gel. Os experimentos de SDS-PAGE e gel bidimensional foram repetidos pelo menos três vezes para confirmar a reprodutibilidade.

Visualização das proteínas, análise de imagem, e quantificação.

Para a coloração com azul de Coomassie coloidal, os géis foram fixados três vezes em solução contendo ácido fosfórico 2% e etanol 30% por 30 min. Em seguida, enxaguados três vezes em ácido fosfórico 2% por 20 min, e incubado em solução contendo etanol 18%, sulfato de amônio 15% e ácido fosfórico 2%, por 30 min. Os géis foram corados pela adição de azul de Coomassie blue G-250 coloidal 0,02% por 72 h. Finalmente, os géis foram mantidos em solução de ácido acético 1% até a digitalização. Os géis corados foram digitalizados e calibrados com o programa *Labscan* (Amersham Biosciences). As análises de imagem foram realizadas no *ImageMaster 2D platinum* (Amersham Biosciences). A detecção dos *spots* e comparação entre os géis foram realizadas no programa *ImageMaster 2D platinum* e foram conferidos e editados manualmente quando necessário. Nas análises, foram considerados como *spots* diferencialmente expressos aqueles que apresentaram uma variação na porcentagem de volume entre os tratamentos de 1,5 vezes ou mais em pelo menos três géis, contendo proteínas oriundas de extrações e réplicas biológicas independentes. .

Identificação dos *spots* com expressão diferencial

Os *spots* foram manualmente excisados do gel 2-DE de 18 cm, transferidos para microtubos de 0,6 mL e digeridos com tripsina. A digestão foi realizada em dois passos. A primeira digestão foi realizada segundo o protocolo de digestão em microondas (Sun *et al.* 2006). A segunda digestão foi realizada nos mesmos pedaços de géis após uma nova adição de tripsina e digestão a 37°C durante a noite. Os fragmentos resultantes da digestão trípica foram analisados no intervalo de 800–3500 Da no instrumento Maldi-TOF-TOF (Modelo 4700 Proteomics Analyser, Applied Biosystems) Version 3.0 software, tanto no modo MS quanto MS/MS. Análises da seqüência de aminoácidos foram realizadas para os cinco picos mais intensos. Alguns peptídeos identificados utilizando somente o modo MS de operação do espectrofotômetro puderam ser utilizados para identificar a proteína correspondente utilizando o algoritmo de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), enquanto que para outros, isto somente foi possível utilizando o modo MS/MS e o algoritmo *MS/MS Ion Score*, ambos contidos no programa *MASCOT4*. As identificações geradas foram confirmadas utilizando os softwares *SCAFFOLD* e/ou *PEAKS*.

Extração de RNA de café e síntese de cDNA para quantificação da expressão gênica utilizando *PCR* em tempo real (qRT-PCR)

A extração foi realizada com o reagente *Concert Plant RNA Reagent* (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante. O cDNA foi sintetizado usando oligo-dT e a enzima M-MLV, utilizando o *kit Superscript III* (Invitrogen) de acordo com especificações do fabricante. A qualidade do cDNA foi testada por PCR com primers específicos para o gene da subunidade maior da Rubisco (Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) para verificar a qualidade do cDNA através da detecção de amplificação de fragmento com o tamanho esperado para este gene.

Para o qRT-PCR, 4µg de RNA total foram tratados com DNase I (Promega, Madison, WI).

Análise de PCR em tempo real

Foram feitos os alinhamentos, tanto de nucleotídeos como proteínas, das seqüências obtidas de *Coffea sp.* no National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando o programa ClustalW (<http://clustalw.genome.jp>) e GeneDoc. As seqüências então foram avaliadas quanto à homologia. A partir dos alinhamentos foi possível desenhar iniciadores específicos para a subunidade maior da enzima Rubisco.

Para as análises de PCR em tempo real, foram usadas as seqüências de cDNA e iniciadores específico para a sub-unidade maior da enzima Rubisco (senso: TGCTGTAGCGAATCGAGTAGCTCTA e antisenso: AGCAAGATCACGCCCTTCATTAC), identificados utilizando o programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Como controle das condições de *déficit* hídrico, utilizamos *primers* desenhados para o gene constitutivo GOS (gene homólogo SUI1, fator de iniciação da tradução); senso: CTGCAATGGTACTGTTGTCCAAGA e antisenso: CGCTGATCCCCTTGGAGTTG) (Gaborit *et al.* 2003). As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando o *kit SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C e 40 ciclos de 94°C por 15 s e 60°C por 1 min. Foi feita a análise da T_m (temperatura média) dos produtos de amplificação na curva de dissociação, realizada pelo instrumento ABI7500. A expressão relativa da expressão gênica foi quantificada usando o método comparativo Ct: $2^{-(\Delta Ct_{\text{Treatment}} - \Delta Ct_{\text{Control}})}$, que se baseia na comparação da expressão do gene alvo (normalizado por controles endógenos) entre amostras controle e experimentais. Os *primers* desenhados apresentaram-se eficientes na amplificação do transcrito desejado. Não foi observado dimerização dos *primers* na curva de dissociação (dado não mostrado) evidenciando apenas um pico, que permite inferir a presença de apenas um produto de PCR.

Resultados e discussão

Caracterização fisiológica nos clones com tolerância diferencial ao *déficit* hídrico

Realizou-se a caracterização das respostas das plantas ao *déficit* hídrico de forma a certificar-se da presença do estresse e da reprodução das respostas de adaptação já observadas por estes genótipos nestas condições (Lima *et al.* 2002 e Pinheiro *et al.*

2003b). Nas plantas controle, o potencial hídrico de antemãhã (ψ_{am}) foi sempre superior a -0.2 MPa (Tabela 1). Nas plantas submetidas ao *déficit* hídrico, observou-se uma redução progressiva do ψ_{am} no decorrer dos dias, sendo essa diminuição mais acelerada no clone 109A (dados não apresentados). O clone 109A (sensível à seca) alcançou o ψ_{am} em torno de -3.1 ± 0.25 MPa no 12º dia após a suspensão da irrigação. Por outro lado, o clone 120 (tolerante à seca) demandou um tempo maior para atingir o mesmo nível de *déficit*, cerca de 14 dias. Estes resultados são consistentes com uma melhor economia hídrica no clone 120 previamente observado (DaMatta *et al.*, 2000; Lima *et al.* 2002; Pinheiro *et al.* 2003b).

A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) decresceu com a progressão do estado de deficiência hídrica (Tabela 1), de forma semelhante entre os clones. Foi observada uma redução de 90% no clone 109A, acompanhado por uma diminuição de 85% no clone 120 (Tabela 1). Apesar da A ter reduzido em decorrência do *déficit* hídrico, não houve fotoinibição, visto que a eficiência fotoquímica (razão F_v/F_M) permaneceu inalterada (Tabela 1), permanecendo similar à plantas controle. Estes resultados confirmam a tolerância das reações fotoquímicas ao *déficit* hídrico em café, conforme descrito por Da Matta *et al.* (1997) e que a relação F_v/F_M não é um indicativo de tolerância à seca nesta espécie de planta. Em contraste, estresse hídrico provocou um decréscimo da condutância estomática (g_s) em todos os clones (Tabela 1), sendo mais pronunciado no clone 120 (88%) nos momentos iniciais do estresse (dados não apresentados). Uma observação importante é o fato de g_s diminuir muito mais rápido nos primeiros dias de estresse no clone 120 sugerindo que uma percepção mais rápida do estresse por este clone poderia ajudar no processo de tolerância, por minimizar a perda de água.

A melhor economia hídrica assim como as raízes mais profundas do clone 120 (Pinheiro *et al.* 2004) podem explicar até certo ponto, observações de campo como maior produtividade deste clone em condições de seca. Por outro lado, o fechamento estomático limita a entrada de CO_2 limitando também a fotossíntese. Se a fotossíntese e a fotorrespiração não utilizarem a maior fração do poder redutor gerada na fase fotoquímica, poderá ocorrer uma sobre-redução da cadeia de transporte de elétrons do cloroplasto e, nessa condição, elétrons podem reduzir o oxigênio molecular, levando à formação de espécies reativas de oxigênio, potencialmente capazes de causar peroxidação de lipídios (Lima *et al.*, 2002) e desnaturação de proteínas (Asada 1999) entre outros danos nas biomoléculas. Além disso, a peroxidação de lipídios de membrana pode resultar na perda da compartimentalização celular, fato facilmente observado pelo conseqüente extravasamento de eletrólitos (Asada, 1999, Lima *et al.*,

2002). Deste modo, é importante avaliar alterações no mecanismo oxidativo de forma a avaliar sua contribuição ao mecanismo de adaptação ao estresse hídrico.

Tabela 1: Efeito do *déficit* hídrico nos parâmetros fisiológicos de *Coffea canephora*

Parâmetro	Clone 109A		Clone 120	
	Controle	<i>Déficit</i>	Controle	<i>Déficit</i>
Dias após suspensão da irrigação	12 dias	12 dias	14 dias	14 dias
Ψ_{pd} (MPa)	-0.19Aa	3,27Ab	-0,14Aa	3,28Ab
A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	6,70Aa	0,76Ab	6,37Aa	0,94Ab
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0.073Aa	0.003Ab	0.099Aa	0.012Bb
F_v/F_m	0.804Aa	0.762Aa	0.821Aa	0.812Aa

Os valores representam as médias de determinações em quatro repetições. Todos os parâmetros foram determinados quando as plantas estressadas atingiram o potencial hídrico de antemanhã (Ψ_{am}) em torno de $-3,1$ MPa. Letras diferentes minúsculas representam diferenças significativas entre médias de cada parâmetro entre os diferentes clones na mesma condição de estresse. Letras diferentes maiúsculas representam diferenças significativas entre médias de cada parâmetro dentro de cada regime hídrico (Teste de Newman – Keuls, $P \leq 0,05$).

Atividade enzimática e danos celulares

Sob *déficit* hídrico, o aparecimento de danos oxidativos é potencializado. Isso ocorre porque as limitações da assimilação do CO_2 precedem à inativação das reações de transferência de elétrons nos cloroplastos, resultando na produção excessiva de poder redutor e ATP. Parte desse excesso pode ser usado na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), potencialmente capazes de resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Smirnoff, 1995; Asada, 1999).

Considerando-se uma possível ocorrência de estresse oxidativo em decorrência do *déficit* hídrico, resultando em uma provável maior acumulação de espécies reativas de oxigênio, foi avaliada a atividade das enzimas APX, SOD, CAT (Figura 1). Não houve diferenças nas atividades das enzimas APX, SOD, CAT na ausência do *déficit* hídrico entre os clones estudados. Sob *déficit* hídrico foi observado aumento da atividade de todas as enzimas avaliadas em ambos os clones. Foi observado um aumento mais pronunciado na atividade das enzimas no clone sensível ao *déficit* hídrico (109A), principalmente na atividade da enzima APX que aumentou 93% (enquanto que clone 120 não houve aumento significativo) e da enzima CAT, que aumentou 95% no clone 109A e 65% no clone 120.

Estes resultados são muito semelhantes a Pinheiro *et al.* (2004), os quais submeteram lentamente as plantas a um *déficit* hídrico, utilizando vasos de 120 L. Estes autores também não observaram diferenças para SOD, enquanto que maior atividade para APX e catalase foi observada, corroborando com os dados aqui obtidos. Por outro lado, estes resultados não concordam com Lima *et al.* (2003), os quais quando submeteram os mesmos clones sob condições de *déficit* hídrico rápido, utilizando vasos de 6 L, observando maiores aumentos para estas enzimas no clone tolerante. Estes resultados contrastantes poderiam ser explicados pela necessidade de um maior período de tempo para que ocorra plena adaptação dos mecanismos de adaptação ao estresse. Alternativamente, mas não exclusivamente, estes experimentos poderiam salientar diferenças temporais entre os clones contrastantes quanto a sua tolerância, apresentando os clones tolerantes uma maior rapidez em ativar o mecanismo antioxidativo do que o clone susceptível, de forma que seria eliminado um excesso de EROs, reduzindo o dano oxidativo (Hazen *et al.* 2005). Poucos estudos têm comparado as diferenças potenciais nas respostas quanto a diferentes taxas de imposição do *déficit* hídrico (Hazen *et al.*; 2005; Talame *et al.*, 2007), mas estes estudos mostram diferenças marcantes quanto a expressão gênica diferencial. Adicionalmente, a maior atividade de CAT e APX observada neste trabalho de Pinheiro *et al.* (2004) para o clone sensível pode estar associada ao maior nível de ABA neste clone sob estresse hídrico severo (Silva, 2007), visto que ABA está relacionada com a maior atividade de CAT e APX em milho (Jiang e Zhang 2002a,b).

Não foi observado diferenças no extravasamento de eletrólitos entre as plantas dos dois clones na ausência de estresse hídrico (Figura 1). Por outro lado nas plantas sob *déficit* hídrico severo houve um aumento muito pronunciado do extravasamento de eletrólitos em ambos os clones. No clone 120 houve aumento de 235% enquanto que no clone 109A o aumento foi de 530%. Mesmo com o aumento da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante mais pronunciado no clone 109A o extravasamento apresentou-se muito maior que no clone 120. Resultados semelhantes também foram observados por Lima *et al.* (2002) e Pinheiro *et al.* (2004), e indica a presença de maior nível de EROS no clone susceptível a seca em condições de *déficit* hídrico. O aumento da peroxidação de lipídeos tem sido observado em outras espécies como ervilha (Moran *et al.*, 1994; Gogorcena *et al.*, 1995) e café (Lima *et al.*, 2002) sob deficiência hídrica. Estes resultados indicam que sistema de defesa a danos oxidativos no clone 120 parece ser mais eficaz na diminuição das EROs diminuindo os danos as membranas.

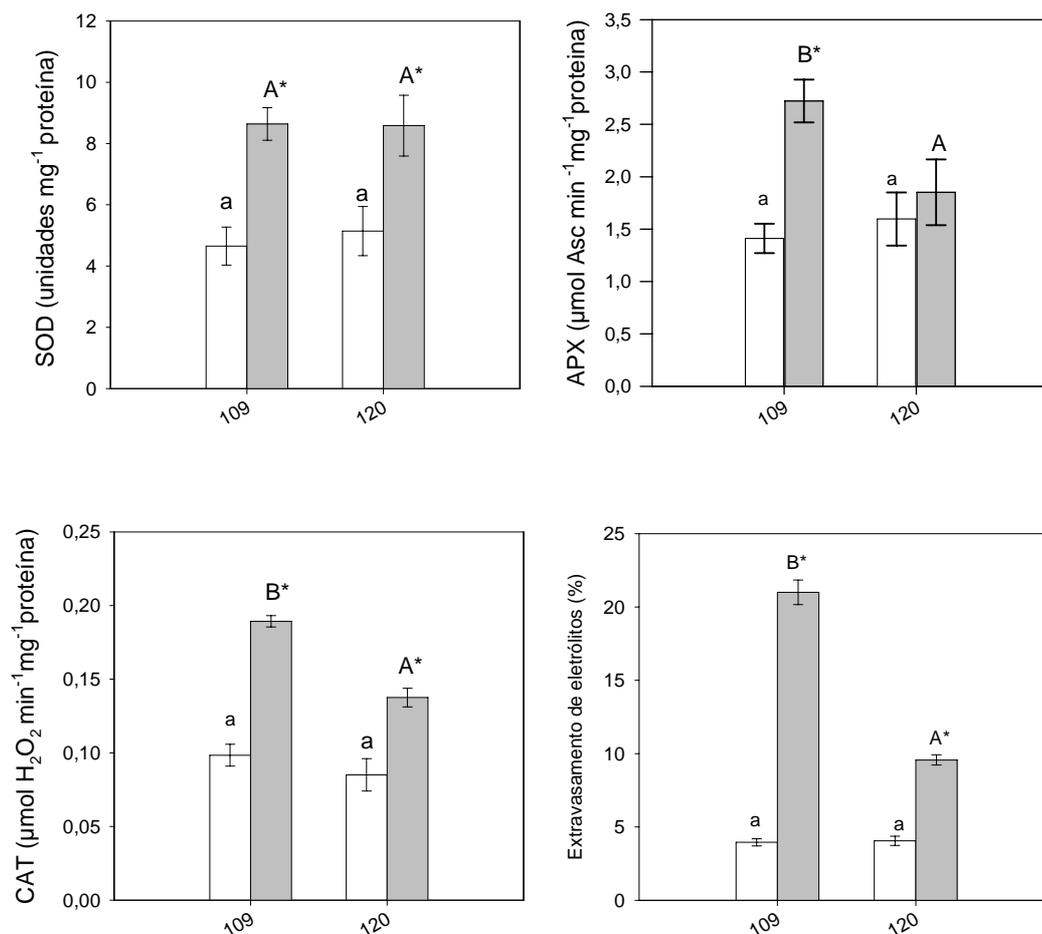


Figura 1: Efeito do déficit hídrico ($\psi_{am} = -3$ MPa) na atividade de enzimas antioxidantes em dois clones de *Coffea canephora*: dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT). Os gráficos representam a atividade total em folha. As colunas brancas são os valores da atividade para plantas controle (ausência de déficit hídrico); as colunas cinza são os valores da atividade para plantas sob condições de déficit hídrico. Os valores representam a média de cinco repetições. Significativas entre médias de cada parâmetro dentro de cada regime hídrico (Teste de Newman – Keuls, $P \leq 0,05$).

Detecção e identificação de proteínas responsivas ao déficit hídrico em clones de café com tolerância diferencial

Os géis com as proteínas de folhas dos dois clones, 109A - sensível e 120 - tolerante ao déficit hídrico, mostraram grande semelhança (Figuras 2 e 3). Os géis foram comparados quanto à porcentagem de volume (% vol) dos *spots* nas plantas controle e submetidas ao déficit hídrico. Os géis contendo as proteínas extraídas de folhas do clone 120 submetido ao déficit hídrico apresentaram 13 proteínas com abundância diferencial em relação aos géis contendo proteínas extraídas de folhas do clone 120 cultivado em condições ótimas de irrigação. Destas 13 proteínas, 9 foram identificadas por espectrometria de massa (Figuras 2 e 4; Tabela 3). Já o clone 109A apresentou 20 proteínas de folha com abundância

diferencial quando submetido ao *déficit* hídrico. Destas 20 proteínas, 8 foram identificadas por espectrometria de massa (Figuras 3 e 4; Tabela 3). Três proteínas foram induzidas em ambos os clones sob condições de *déficit* hídrico em comparação com condições ótimas de irrigação (a, b, c, nas Figuras 2 e 4). No total foram identificadas 14 proteínas responsivas ao *déficit* hídrico em café.

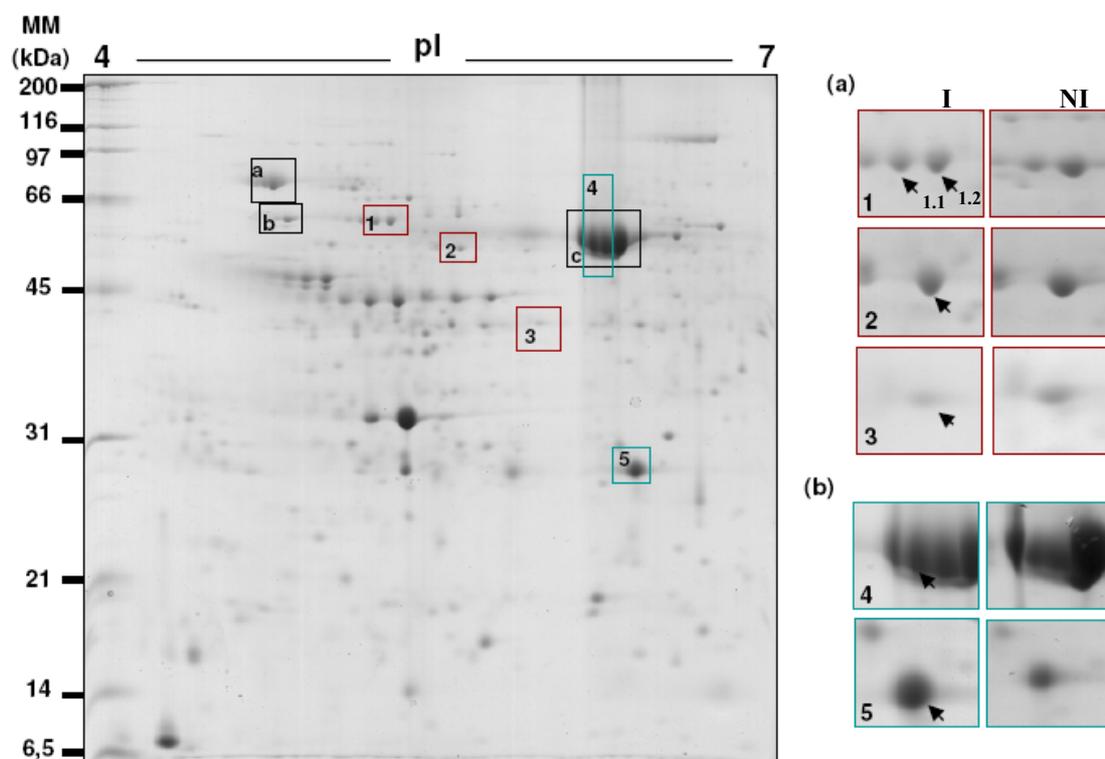


Figura 2: Mudanças na abundância de proteínas de folha do clone tolerante (120) de *Coffea canephora* submetido a *déficit* hídrico (-3 MPa). As proteínas foram separadas por gradiente linear de pH imobilizado 4–7 foi subsequentemente separado por SDS-PAGE e os tratamentos comparados pelo software ImageMaster. (a) proteínas induzidas pelo estresse; (b) proteínas que apresentaram diminuição em sua abundância. As setas indicam as proteínas responsivas ao *déficit* hídrico que foram identificadas. Sobre as caixas: I, proteínas representativas dos géis irrigados e NI, proteínas representativas dos géis não irrigados (sob *déficit* hídrico). Spots marcados com letras indicam proteínas com expressão alterada em ambos os clones na presença do estresse.

Proteínas responsivas ao *déficit* hídrico no clone tolerante (120)

No clone 120, os *spots* 1, 2 e 3 (Figura 2a) tiveram um aumento na abundância em decorrência do *déficit* hídrico. A proteína representada pelo spot 1.1 apresentou aumento de 1,7 vezes em sua abundância no clone 120 sob *déficit* hídrico (Tabela 2). O mesmo foi observado para a proteína do *spot* 1.2 (aumento de 1,8), porém este *spot* apresentou uma abundância muito baixa no clone 109A (Tabela 2) em ambas as condições irrigado (I) e não irrigado (NI), quando comparado com os valores relativos ao clone 120. Estes *spots* foram identificados como chaperoninas HSP 60.

A proteína correspondente ao *spot* 2 (Figura 2), apresentou aumento em sua abundância em torno de 2,7 vezes no clone 120 em decorrência do *déficit* hídrico, enquanto que no clone 109A permaneceu constante (Tabela 2). A proteína do *spot* 4 (Figura 2) apresentou diminuição de abundância no clone 120 de 1,8 vezes e aumento de abundância no clone 109 de 1,3 vezes (Tabela 2). O *spot* 2 (Figura 2) assim como os *spots* 4 (Figura 4) e *spot* c (Figuras 2 e 4) foram identificados como sendo a subunidade maior da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (Rubisco). A exemplo do clone 120, o clone 109A apresentou aumento na abundância para esta isoenzima Rubisco (*spots* 8 e c - Figuras 3 e 4; Tabela 2).

A proteína referente ao *spot* 3 (Figura 2) foi identificada como uma possível quinona oxidoreductase (NAD(P)H:quinona redutase) e apresentou aumento de 1,9 vezes em sua acumulação no clone 120 (Tabela 2). O *spot* 5 foi identificado como um polipeptídeo de 23 kDa do complexo de oxidação da água no fotossistema II (PSII) e apresentou uma diminuição na abundância de 1,8 vezes no clone 120 (Tabela 2) em decorrência do tratamento. Este *spot* apresentou uma tendência de diminuição também no clone 109A (Tabela 2).

Os *spots* a, b e c (Figura 2 e 4) apresentaram aumentos similares em ambos os clones (Tabela 2) com exceção do *spot* b que aumentou mais no clone 120 (2,5 vezes) que no clone 109A (1,5 vezes; Tabela 2).

Tabela 2: Média da abundância (% volume) das proteínas responsivas ao *déficit* hídrico em *Coffea canephora*

Spots	Clone 109A		Clone 120	
	I	NI	I	NI
1.1	0,373 (0,027)	0,261 (0,05)	0,378 (0,044)	0,633 (0,084) ^a
1.2	0,039 (0,003)	0,025 (0,004)	0,231 (0,05)	0,413 (0,035) ^a
2	0,439 (0,054)	0,352 (0,07)	0,229 (0,035)	0,630 (0,048) ^a
3	0,350 (0,072)	0,238 (0,063)	0,168 (0,036)	0,328 (0,017) ^a
4	3,274 (0,65)	4,142 (0,54)	5,667 (0,446)	2,883 (0,503) ^b
5	4,233 (0,485)	2,885 (0,094)	3,387 (0,066)	1,865 (0,554) ^b
6	0,306 (0,042)	0,733 (0,088) ^a	0,448 (0,128)	0,408 (0,052)
7	0,429 (0,088)	0,649 (0,013) ^a	0,412 (0,121)	0,545 (0,285)
8	0,569 (0,143)	1,805 (0,336) ^a	0,451 (0,068)	0,478 (0,002)
9	0,254 (0,014)	0,157 (0,038) ^b	0,292 (0,038)	0,328 (0,017)
10	nd	0,302 (0,120)	nd	nd
a	0,86 (0,172)	1,569 (0, 139) ^a	0,925 (0,195)	1,766 (0,065) ^a
b	0,361 (0,014)	0,543 (0,071) ^a	0,324 (0,032)	0,810 (0,082) ^a
c	7,782 (0,691)	14,647 (1,878) ^a	9,179 (1,016)	18,960 (2,437) ^a

Os valores representam as médias da porcentagem de volume em três repetições das plantas controle (I) e sob *déficit* hídrico (NI). O valor entre parênteses equivale ao erro padrão. *Spots* referentes às Figuras 2 e 3. Nd, *spot* ausente no gel. Ver Tabela 3 para identificação das proteínas.

a) Efeito do tratamento aumentou a abundância significativamente, P<0,05

b) Efeito do tratamento diminuiu a abundância significativamente, P<0,05

NAD(P)H:quinona oxidoreductase está amplamente distribuída nos organismos vivos. Em humanos NAD(P)H:quinona oxidoreductase, também chamada de *DT-diaphorase*, está envolvida no processo de destoxificação e ativação de uma variedade de substratos (Ross *et al.* 2000). Alguns trabalhos de imunohistoquímica têm mostrado que NAD(P)H:quinona oxidoreductase é expressa em alguns tecidos humanos normais bem como em tumores de tireóide, mama, ovário, colo, córnea e pulmão (Siegel *et al.*, 1998; Siegel e Ross, 2000). Em plantas esta enzima pode estar correlacionada com a manutenção da abundância das quinonas (Leistner 1981) e no estado de óxido-redução da célula. Tem sido especulado que o equilíbrio quinona/quinol pode funcionar na célula como modulador do metabolismo secundário (Kovacs1973), interação entre hospedeiro e parasita (Friè 1969) e mecanismos de regulação do crescimento (Psenakova *et al.* 1975). NAD(P)H:quinona oxidoreductase participa, também, diretamente da destoxificação de aldeídos tóxicos reativos originados na peroxidação de

lipídios de membranas associados ao estresse oxidativo, como determinado para a isoforma P1-cristalina desta enzima em *Arabidopsis* (Mano *et al.*, 2002). Visto a detecção do aumento no acúmulo nesta proteína justamente no clone tolerante em que foi observado menor dano oxidativo, sugerimos que esta enzima tem um importante papel na maior destoxificação de espécies reativas de oxigênio sob estresse hídrico neste clone. Vale ressaltar o possível papel desta enzima em consumir NADPH, aumentando assim a drenagem da energia dos elétrons transportados nas reações fotoquímicas. A existência de atividade cloroplastídica específica para oxidação de NADPH foi mostrada por Cuello *et al.* (1995) e Sazanov *et al.* (1996). Esta enzima também faz parte do complexo I da respiração. Em plantas, o estresse térmico associado a altas temperaturas reduz drasticamente a atividade deste complexo, e a tolerância a este estresse pode estar associada a mecanismos que promovem o aumento da atividade desta enzima (Priault *et al.* 2006). Também Gorantla (2007) observou aumento na acumulação de uma quinona oxidoreductase em um cultivar de arroz tolerante ao *déficit* hídrico. Esta concordância sugere um importante papel para esta enzima na tolerância ao estresse hídrico no café, e amplia o número de possíveis mecanismos antioxidativos que poderiam contribuir neste processo em plantas.

O polipeptídeo de 23 kDa (PsbP) é uma proteína extrínseca ao complexo de oxidação da água no fotossistema II (PSII) e apresentou uma diminuição na abundância em decorrência do *deficit* hídrico no clone 120 (spot 5, Figura 2). O complexo de evolução/complexo de oxidação da água 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 (Ono e Inoue, 1983, Ghanotakis *et al.* 1984, Ljungberg *et al.* 1986), também chamadas de PsbO, PsbP e PsbQ, respectivamente. Tem sido sugerido que os polipeptídeos de 23 e 16 kDa participam de rotas regulatórias e não diretamente da oxidação da água (Ghanotakis *et al.* 1984). Adicionalmente, PsbP protege o grupo de átomos Mn do complexo de evolução do oxigênio de agentes redutores exógenos ou mantém o Mn (Mn^{+2}) reduzido na vizinhança do PSII (Ifuku *et al.* 2005). A evolução de oxigênio é determinada pela taxa de transporte de elétrons e não é considerada uma limitação *per se* para assimilação de carbono (A) sob *déficit* hídrico (Badger 1985). Estes resultados sugerem que limitações na atividade do complexo de evolução da água poderia ser uma forma de diminuir o fluxo de elétrons e a possível formação de EROs.

No presente trabalho, enquanto uma isoforma de Rubisco apresentou aumento somente no clone sensível (spot 8, Figura 3), outra isoforma apresentou redução somente no clone tolerante (spot 4, Figura 2), em condições de *déficit* hídrico. Estas

alterações podem estar relacionadas entre si, e ser resultado de alguma modificação pós-traducional. Estas modificações podem sugerir que mudanças pós-traducionais em isoformas da Rubisco possam também contribuir para a tolerância à seca. Adicionalmente foi observado que outra terceira isoforma isoelétrica da Rubisco (*spot c*, Figura 4) apresentou aumento em sua acumulação em ambos os clones. Estas modificações nestas isoformas de Rubisco parecem indicar que mudanças pós-traducionais, ou outras mudanças na expressão gênica possam ter papel na aclimatação ao estresse hídrico, e não relação direta com a tolerância a este estresse. Alguns estudos como de Ali e Komatsu (2006), que trabalharam com estresse hídrico em arroz, observam uma redução na expressão de algumas isoenzimas da Rubisco. Já Gorantla (2005) trabalhando com um cultivar *Indica* de arroz tolerante ao *déficit* hídrico, encontrou aumento na expressão dentre outros genes responsivos ao *déficit* hídrico a subunidade maior da Rubisco. Outros trabalhos mostram o aparecimento de fragmentos da Rubisco em decorrência de degradação na presença de estresse hídrico e tratamentos com jasmonato, respectivamente (Salekdeh *et al.* 2002 e Rakwal e Komatsu 2000). Estes aumentos na acumulação de algumas isoformas da Rubisco, a princípio parecem ser contraditórios, uma vez que com estresse hídrico há uma diminuição da entrada de CO₂ e conseqüente diminuição da fotossíntese (A) (Tabela 1). Por outro lado a enzima Rubisco apresenta não somente a atividade carboxilase como também a atividade oxigenase, processo este chamado fotorrespiração. A fotorrespiração pode proteger os aparatos fotossintéticos contra a fotoinibição (Park *et al.* 1996; Osmond *et al.* 1997) por manter a cadeia de transporte de elétrons ativa não deixando elétrons se acumularem e formarem EROs. Em conjunto, o fato de que um maior número de modificações na acumulação da proteína foi relacionado com a Rubisco, sugere que o aumento da acumulação de algumas isoformas, resultante ou não de mudanças pós-traducionais, poderia conferir maior tolerância, ou a melhor aclimatação ao provável estresse oxidativo. O exato mecanismo da contribuição da Rubisco permanece ainda obscuro, mas este trabalho salienta a necessidade de um estudo mais pormenorizado desta possível contribuição desta enzima na respostas das plantas ao estresse hídrico e/ou oxidativo.

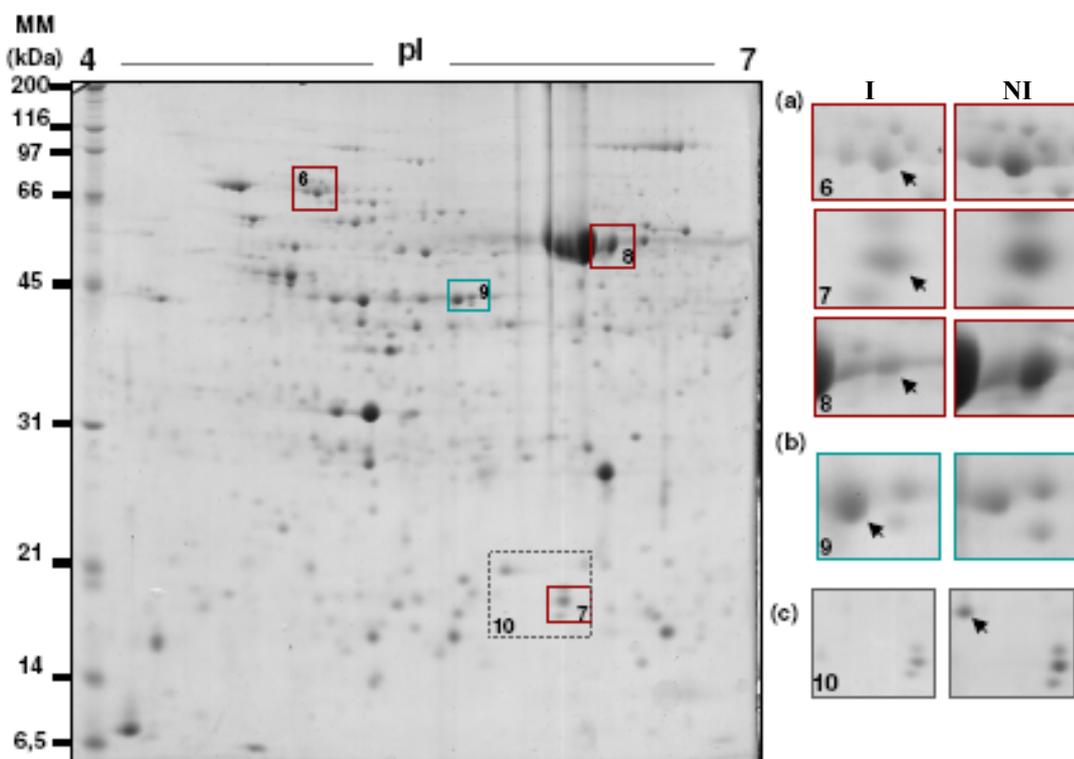


Figura 3: Mudanças na abundância de proteínas do clone sensível (109A) de *Coffea canephora* submetido a déficit hídrico. Gel do clone 109A em condições de déficit hídrico. As proteínas foram separadas por gradiente linear de pH imobilizado 4–7 foi subsequentemente separado por SDS-PAGE e os tratamentos comparados pelo software ImageMaster. (a) proteínas que apresentaram aumento de abundância; (b) proteínas que apresentaram diminuição de abundância e (c) proteína expressa apenas sob déficit hídrico. As setas indicam as proteínas responsivas ao déficit hídrico que foram identificadas. Sobre as caixas: I, proteínas representativas dos géis irrigados e NI, proteínas representativas dos géis não irrigados (sob déficit hídrico).

Proteínas responsivas ao déficit hídrico no clone sensível (109A)

No clone 109A, como mostrado nas Figuras 3 e 4, as proteínas referentes aos *spots* 6, 7, 8 (Figura 3a), e aos *spots* a, b e c (para ambos os clones; Figura 4) tiveram um aumento na abundância em decorrência do déficit hídrico. Por outro lado, os *spots* 9 e 10 (Figura 3b) tiveram sua abundância reduzida no clone 109.

Foram identificadas 6 proteínas hsp (*Heat shock protein*) que tiveram aumento em sua acumulação sob estresse hídrico severo, sendo duas hsp 70, (*spots* 6 e a) (Figura 3 e 4), além de uma pequena hsp (17.7 kDa) *spot* 7 (Figuras 3 e 4) e três hsp60, *spot* 1.1, 1.2 e b (Figuras 2 e 4). Todas as seis hsp tiveram seu aumento induzido pelo estresse hídrico sendo os *spots* 1.1 e 1.2 no clone 120 e *spots* 6, a e b no clone 109A (Tabela 2). O *spot* 6 (Figura 3) não apresentou diferença de abundância no clone 120 (Tabela 2) enquanto que aumentou 2,4 vezes no clone 109A em decorrência do déficit hídrico. O

spot 7 apresentou um aumento de 1,5 vezes (Tabela 2) no clone 109A em decorrência do tratamento. A proteína do *spot 9* (Figura 3) foi identificada como uma proteína plastídica precursora da glutamina sintetase (GS). Esta GS apresentou diminuição da abundância de 1,6 vezes (Tabela 2) apenas no clone 109A em decorrência do *déficit* hídrico e não apresentou diferença na abundância (Tabela 2), após o *déficit* hídrico, no clone 120. O *spot 10* (Figura 3, Tabela 2) foi identificado como precursora da proteína de 33kDa (PsbO) do complexo de evolução do fotossistema II (PSII). Este *spot* só foi observado no tratamento do clone 109A.

Hsps são proteínas geralmente envolvidas em proteção, reparo e degradação de componentes danosos à célula, especialmente proteínas, durante muitos estresses abióticos (Parsell e Lindquist, 1994; Downs *et al.*, 1999; Hamilton e Heckathorn, 2001). Hsps são sintetizadas e acumuladas em tecidos muito desidratados. Elas auxiliam no dobramento protéico (Schöffl *et al.* 1998). Sua síntese é aumentada quando proteínas não são corretamente formadas e a quantidade de ATP é limitada (Kabakov e Gabai 1997). Hsps são capazes de manter proteínas associadas em um estado competente, dobradas ou não dobradas desse modo, minimizando as agregações protéicas não nativas, ou então marcando como alvos para degradação ou remoção da célula (Feder e Hofmann, 1999; Hoekstra *et al.* 2001). Durante o *déficit* hídrico, uma estratégia de sobrevivência é também evitar proteínas mal dobradas, mantendo as proteínas em suas conformações funcionais e prevenindo agregação de proteínas não nativas (Wang *et al.* 2003). Um crescente número de estudos sugere que as hsp interagem com outros mecanismos de resposta a estresses, mecanismos estes que atuam coordenadamente ou sinergicamente para prevenir danos celulares e restabelecer a homeostase celular (Wang *et al.* 2004). O aumento da expressão de hsp é esperado como elemento de um mecanismo de adaptação ao estresse, visto que nestas condições, o dano oxidativo pode levar ao mal dobramento das proteínas, ativando a expressão destas proteínas com atividade de chaperonas moleculares. Entretanto, o fato de que duas destas proteínas não terem seus níveis alterados no clone tolerante, parece indicar a presença de um menor nível de estresse oxidativo no clone tolerante, o que corrobora com os dados indicando o menor nível de extravasamento de eletrólitos nestas plantas. Por outro lado, estes resultados também sugerem um diferente papel para estes diferentes genes, e que, no nível de estresse aqui estudado (estresse severo), as chaperonas teriam mais um papel no mecanismo de adaptação ao estresse do que na tolerância ao mesmo, visto que não foi possível detectar, dentre as quatro isoformas identificadas, nenhuma que tivesse aumento de sua acumulação somente no clone tolerante.

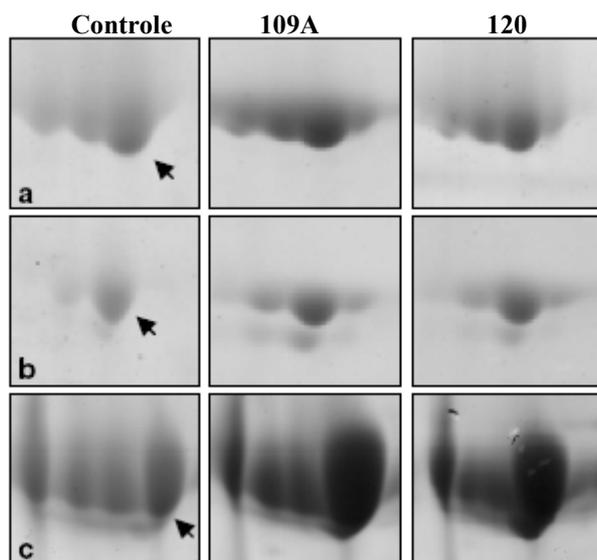


Figura 4: Proteínas com aumento de abundância tanto no clone sensível (109A) quanto no clone tolerante (120) de *Coffea canephora* submetido a déficit hídrico. As proteínas foram separadas por gradiente linear de pH imobilizado 4–7 foi subsequentemente separado por SDS-PAGE e os tratamentos comparados com o software ImageMaster. As setas indicam as proteínas a,b e c responsivas ao déficit hídrico que foram identificadas. Na vertical, primeira coluna refere-se ao clone 109A na ausência do déficit hídrico, segunda coluna ao clone 109A sob déficit hídrico e terceira caixa clone 120 déficit hídrico. As setas indicam as proteínas responsivas ao déficit hídrico e que foram identificadas.

Glutamina sintetase (GS) é uma enzima chave envolvida na assimilação de nitrogênio inorgânico em formas orgânicas. Duas diferentes classes de GS tem sido reportadas em angiospermas: GS₁ isoforma citosólica e GS₂ isoforma cloroplastídica. Alguns trabalhos têm mostrado que, GS₂ é codificado por um gene único nuclear e a rota funcional seria a assimilação do amônio derivado da redução do nitrato e da fotorrespiração (Lam *et al.*, 1996). Para evitar o acúmulo de amônia, que é uma molécula muito tóxica, durante a fotorrespiração há uma rápida reassimilação desta amônia. Em algumas espécies a amônia reassimilada da fotorrespiração serve como a principal forma de assimilação de nitrogênio excedendo a assimilação primária em até 10 vezes (Keys *et al.*, 1978, Buchanan *et al.* 2000). Mutantes de cevada (*Hordeum vulgare*) defectivo em GS₂ são incapazes de reassimilar amônia da fotorrespiração e morrem quando crescidas em contato direto com o ar indicando que GS₂ é a maior rota de reassimilação de amônia da fotorrespiração nas células do mesofilo da folha (Wallsgrave *et al.*, 1987; Lea e Forde, 1994). Estudos recentes têm mostrado que características de importância agrônômicas tem sido introduzidas em plantas herbáceas transgênicas pela expressão heteróloga de isoenzimas de GS. Desta maneira, uma alta capacidade para fotorrespiração (Kozaki e Takeba, 1996) e aumento na tolerância a estresse salino (Hoshida *et al.*, 2000) tem sido reportados usando plantas que super-expressam GS₂. A redução no teor desta enzima somente no clone sensível e sob estresse hídrico, sugere que uma menor capacidade de assimilar amônio pode comprometer a eficiência fotorrespiratória neste clone, reduzindo a capacidade de

drenagem do excesso do poder redutivo originado nas reações fotoquímicas sob estresse hídrico. O maior nível de dano oxidativo observado neste clone corrobora para este resultado. Estudos de super-expressão de GS₂ em tabaco têm mostrado que o incremento nos níveis de GS₂ leva ao aumento da fotorrespiração e conseqüentemente resistência a fotooxidação (Kozaki e Takeba, 1996). Desta forma, os resultados aqui apresentados constituem evidência adicional para a importância da fotorrespiração no mecanismo de tolerância ao *déficit* hídrico, e sugerem que a tolerância à seca no clone 120 pode estar ligada a uma maior capacidade fotorrespiratória do o clone sensível.

Tabela 3: Proteínas responsivas ao *déficit* hídrico em clones de café com tolerância diferencial identificadas por espectrometria de massa.

Spot	Maldi-Tof-Tof		Proteína	Espécie	Número de acesso	pI Obs ^B /Exp	Mass (kDa) Obs ^B /Exp ^C
	Seqüências*	Protein score C.I.% ^A					
1.1	VVAAGANPVLITR	48,8	chaperonin-60 beta subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 1762130	5.73/5.3	63/62
	GYISPYFVTDSEK	96,7					
1.2	VAALKAPGFGER	61,1	chaperonin-60 beta subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 1762130	5,73/5.4	63/62
	DATTIVGDGSTQEAV NKR	96,1					
2	TFQGPPHGIQVER	99,9	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit	<i>Coffea sp.</i>	gi 11230404	5.96/5.6	52/55
	GMGRLDFTKDDENV	100					
	NSQPF	100					
	LRTYYTPEYETKDTDI LAAFR	100					
3	QFGSLAEYTAVEEK	100	Quinone oxidoreductase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 21553644	5.89/6.0	33/37
	ATDVVKSPLPTVPGY	100					
	DVAGV	100					
	FKATDSPLPTVPGYD	99,7					
	VAGVVVK	99,7					
4	FCFCAEALYK	93,3	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit	<i>Coffea sp.</i>	gi 11230404	5.96/6.2	52/55
	TFQGPPHGIQVER	100					
	GGLDFTKDDENVNSQ	100					
	PFMR	100					
	LTYTPEYETKDTDIL AAFR	100					
5	EVEFPGQVLR	99,9	23 kDa polypeptide of water-oxidizing complex of photosystem II	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 417604	8.3/6.5	29/29
	WNPSKEVEFPGQVLR	100					
6	TTPSYVGFTDTER	57,2	Heat shock protein 70	<i>Petunia x hybrida</i>	gi 20559	5.07/5.2	71/69
	NAVVTVPAYFNDSQR	99,6					
	EQVFSTYSDNQPGVLI	95,1					
	QVYEGER	95,1					
7	FRLPENAK	99,2	17.7 kDa heat shock protein	<i>Helianthus annuus</i>	gi 1235898	6.19/6.2	18/19
	IDWKETPEAHVFK	100					

8	DTDILAAFR	96,1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit	<i>Diplospora polysperma</i>	gi 11230416	6.13/6.3	52/55
	DNGLLLHIHR	86,4					
	DLAAEGNEIHR	47,2					
	TFQGPPHGIQVER	100					
9	LTGKHETASIDQFSW	99	Plastidic glutamine synthetase precursor	<i>Brassica napus</i>	gi 1934754	5.99/5.7	47/44
	GVANR	100					
	GPTGNNKNRILVICDT						
	YTPAGEPIPTNKR						
10	VPFLFTIK	99,9	33kDa precursor protein of oxygen-evolving complex	<i>Lycopersicon esculentum</i>	gi 19157	5.91/5.8	35/21
	RLTYDEIQSK	99,7					
	DGIDYAAAVTVQLPGG	100					
	ER						
a	IPAVQDLVR	100	Heat shock protein 70	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 6746592	5.13/4.8	77/78
	AVITVPAYFNDSQR	100					
	QAVVNPENTFFSVKR	98,6					
	SEVFSTAADGQTSVEI	100					
	NVLQGER						
b	LLVEFENAR	99,7	Chaperonin-60 alpha subunit	<i>Brassica napus</i>	gi 415925	5.14/4.9	62/62
	GYISPPQFVTNPEK	100					
c	WSPELAAACEVWKEI	99,5	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit	<i>Coffea sp.</i>	gi 11230404	5.96/6.4	52/55
	R						
	LTYYTPEYETKDTDIL	100					
	AAFR						

* - Sequências dos peptídeos fragmentados (MS/MS)

a- Probabilidade da proteína encontrada ser a mesma proteína depositada no banco de dados (algoritmo MASCOT)

b- pI and Mr encontrados pela identificação tanto por Peptide Mass Fingerprinting (PMF) quanto por MS/MS Íon Score utilizando o algoritmo MASCOT4.

c- pI and Mr experimental (observado) os valores foram calculados usando ImageMaster 2D Platinum software.

No presente trabalho foi observado que ao passo que um dos componentes do complexo de evolução do oxigênio do fotossistema, tem sua expressão reduzida no clone tolerante (unidade 23KDa), outra (33 KDa), tem abundância aumentada no clone susceptível. Tem sido atribuído ao polipeptídeo de 33kDa (PsbO) o papel de estabilizador do centro tetranuclear de manganês, no fotossistema II (PSII) (Yamamoto *et al.* 1984; Ono e Inoue 1983) bem como em processos regulatórios (De Las Rivas e Barber, 2004). O polipeptídeo de 33kDa apresenta-se como peça central na manutenção e função do PSII uma vez que mutantes deste gene não apresentam evolução de oxigênio apesar de ter níveis normais dos polipeptídeos de 23 e 16kDa (Mayfield *et al.* 1987 e Rochaix e Erickson, 1988). Tem sido sugerido também, a partir de experimentos *in vitro* em espinafre (Yamamoto *et al.*, 1998), uma função de chaperona para PsbO por prevenir agregação da proteína D1 do PSII. Recentemente, tem sido mostrado que PsbO de espinafre liga-se a GTP radioativo (Spetea *et al.*, 2004), com possível

relevância para degradação dependente de GTP e *turnover* da proteína D1 sob condições estresse luminoso (Spetea *et al.*, 1999, 2000). Uma possível explicação para o fato da abundância desta proteína apresentar somente aumento no clone susceptível na presença do estresse, pode ser devido a um mecanismo de adaptação ao maior efeito do dano oxidativo nas proteínas dos fotossistemas neste clone, o que pode ser inferido a partir do possível maior teor de EROs nos cloroplastos, o qual estaria associado a menor capacidade de síntese de glutamina, e ao maior nível de extravasamento de eletrólitos neste clone. Entretanto, não observamos nenhuma evidência para algum dano na proteína D1, o qual teria efeito notório nos parâmetros de fluorescência. Estes dados parecem sugerir uma maior susceptibilidade do complexo de evolução do oxigênio ao estresse oxidativo no café em relação à proteína D1.

Análise PCR em tempo real

Como pode ser visto na Figura 5 não houve alteração da expressão do gene da subunidade maior da Rubisco em decorrência do estresse hídrico nos dois clones estudados. Esta discrepância entre o nível de acumulação do transcrito e da proteína potencialmente derivada deste, pode ser explicada de diferentes maneiras. Primeiramente, os dados aqui apresentados poderiam sugerir que o aumento nos níveis da proteína (observado nos dados de proteoma) poderia provavelmente ser resultado do aumento na transcrição do gene de uma outra isoforma, ainda não identificada devido à pequena seqüência polipeptídica obtida e as limitações advindas deste fato ligadas à identificação de isoformas que apresentam alta homologia em nível de seqüência. Alternativamente, a mudança na abundância de algumas isoformas, com a redução de outras pode estar sendo devido somente a mudanças pós-traducionais, as quais alterariam o *pI* da proteína, explicando estas modificações, ou ainda, de forma não excludente, ligadas a diferentes taxas de tradução e ou estabilidade da proteína. Mais experimentos serão necessários para verificar qual destas hipóteses explica este fato observado.

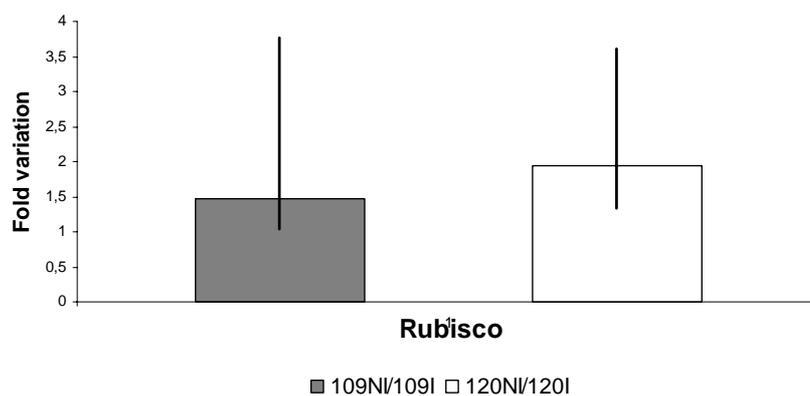


Figura 5: Análise PCR em tempo real: Aumento da expressão da subunidade maior da Rubisco tanto no clone sensível (109A) quanto no clone tolerante (120) de *Coffea canephora* submetido a *déficit* hídrico. O gráfico mostra a variação da expressão do tratamento (NI) em relação ao controle (I). As barras são os desvios padrão das médias.

Conclusões

O *déficit* hídrico promoveu reduções na taxa de assimilação líquida de CO₂ nos dois clones estudados, sendo tais reduções acompanhadas pela redução da condutância estomática. Pode-se inferir que o fechamento estomático permitiu um controle eficiente da perda de água, pelo menos no clone 120, e que as reduções nas taxas fotoquímicas não foram decorrentes de possíveis danos na maquinaria de absorção de energia luminosa, visto a ausência de alterações nos parâmetros de fluorescência das clorofilas.

O tempo relativamente lento de indução do *déficit* hídrico, assim como, o tamanho do vaso podem ter sido suficientes para permitir o estabelecimento de mecanismos de adaptação ao *déficit* hídrico nas plantas, como usualmente se observam sob condições de campo, em que os *déficits* hídricos são estabelecidos de forma gradual. Este fato, até certo ponto, pode explicar a similaridade dos resultados entre os clones.

Os dados aqui mostrados sugerem que um dos mecanismos de aclimação ao estresse hídrico usado pelos clones de *Coffea canephora* estudados seria a fotorrespiração, como mecanismo de drenagem de um excesso de poder redutor associado com a redução da fotossíntese líquida sob condições de estresse. Os resultados obtidos indicam a existência de mecanismos de adaptação a um possível dano oxidativo decorrente do estresse hídrico. O aumento na expressão de alguns chaperones moleculares e de algumas proteínas dos fotossistemas, e a maior expressão de algumas isoformas de Rubisco poderiam estar contribuindo para a manutenção do papel antioxidativo da fotorrespiração. Por outro lado, o fato de que somente no clone tolerante, na presença do estresse, houve maior acumulação de uma NADPH-quinona redutase, e a manutenção da abundância da glutamina sintase, sugerem que a primeira enzima pode ter importante papel no mecanismo antioxidativo associado à tolerância à seca neste clone, bem como a importância da manutenção da assimilação da amônia e da fotorrespiração nestas condições. Estes dados sugerem que a provável maior fotorrespiração no clone tolerante possa também ter uma contribuição na tolerância à seca.

Referências Bibliográficas

- Alfonsi, E. L., Fahl, J. I., Carelli, M. L. C., Fazuoli, L. C.** Crescimento, fotossíntese e composição mineral em genótipos de *Coffea* com potencial para utilização como porta enxerto. *Bragantia* 64:1-13, 2005.
- Ali, G. M. e Komatsu S.** Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress *J. Proteome Res.* 5:396 – 403, 2006.
- 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.
- Badger M. R.** Photosynthetic oxygen exchange. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 36: 27– 53, 1985.
- Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 248-254, 1976.
- Buchanan, B. B., Gruissen, W. E Jones, R. L.** *Biochemistry and molecular biology of plants.* Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- Cuello, J., Quiles, M. J., Albacete, M. E., Sabater, B.** Properties of a Large Complex with NADH Dehydrogenase Activity from Barley Thylakoids *Plant Cell Physiol.* 36:265–271, 1995.
- DaMatta, F. M. e Rena, A. B.** Tolerância do café à seca. In: Zambolim, L. (Ed.). *Tecnologias de Produção de Café com Qualidade.* Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 65-100, 2001.
- DaMatta, F. M.** Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review, *Field Crops Research*, 86: 99 – 114, 2004.
- DaMatta, F. M., Chaves, A. R. M., Pinheiro, H. A., Ducatti, C., Loureiro, M. E.,** Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Science.* 164, 111-117, 2003.
- DaMatta, F. M., Maestri, M., Barros, R. S.** Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica* 34:257-264, 1997.
- DaMatta, F. M., Silveira, J. S. M., Ducatti, C., Loureiro, M.E.** Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil.* EMBRAPA-CAFÉ, Poços de Caldas, 907-910, 2000.

- DaMatta, F. M. e Ramalho, J. D. C.** Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review *Brazilian Journal of Plant Physiology.*, 18(1):55-81, 2006.
- DaMatta, F. M.** Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16:1-6, 2004.
- De Las Rivas, J. and Barber, J.** Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications. *Photosynth. Res.* 81:329–343, 2004.
- Downs, C. A., S. L. Ryan, e S. A. Heckathorn.** The chloroplast small heat-shock protein: evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidative stress and photoinhibition. *Journal of Plant Physiology* 155: 488–496, 1999.
- Fahl, J. I., Carelli, M. L. C., Menezes, H. C., Gallo, P. B., Travelin, P. C. O.** Gas exchange, growth, yield and beverage quality of *Coffea arabica* cultivars grafted onto *C. canephora* and *C. congensis*. *Experimental Agriculture* 37:241-252, 2001.
- Fazuoli, L. C.** Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena, A.B.; Malavolta, E.; Rocha, M.; Yamada, T. (Eds.), *Cultura do cafeeiro - fatores que afetam a produtividade*. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, 87-113, 1986.
- Feder, M. E. e Hofmann, G. E.** Heat-shock protein, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243–282, 1999.
- Ferrão, R. G., Fonseca, A. F. A., Ferrão, M. A. G.** 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, 2000a.
- Ferrão, R. G., Fonseca, A. F. A., Ferrão, M. A. G., Santos, L. P.** Comportamento de clones elites de café conilon em condições de alta tecnologia no estado do Espírito Santo. In: *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. EMBRAPA-CAFÉ, Poços de Caldas 769-771, 2000b.
- Friè, F.** *Biologia*, 24, 54-69, 1969; ; citado por **SPITSBERG, V. L. e COSCIA, C. J.** Quinone Reductases of Higher Plants. *Eur. J. Biochem.* 127:67-70, 1982.
- Gaborit, C., Caillet, V., Deshayes, A. e Marraccini, P.** Molecular cloning of a full-length cDNA and gene from *Coffea arabica* encoding a protein homologous to the yeast translation initiation factor SUI1: expression analysis in plant organs *Braz. J. Plant Physiol.*, 15:55-58, 2003.

- Ghanotakis, D. F., Topper, J. N., Babcock, G. T., e Yocum, C. F.** Water soluble 17 and 23 kDa polypeptides restore oxygen evolution activity by creating a high-affinity binding site for Ca²⁺ on the oxidizing site of photosystem II, *FEBS Lett.*, 170:169–173, 1984.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K.** Superoxide dismutases occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59:309-314, 1977.
- Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P. R., Becana, M.** Antioxidant defences against activates oxygen in pea nodules subjectes to water stress. *Plant Physiol.* 108:753-759, 1995.
- Gorantla, M., Babu1, P. R., Lachagari1, V. B. R., Reddy1, A. M. M., Wusirika, R., Bennetzen, J. L., Reddy, A. R.** Identification of stress-responsive genes in an indicarice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings *Journal of Experimental Botany*, 58:253–265, 2007.
- Hamilton, III, E. W., and Heckathorn, S. A.** Mitochondrial adaptations to NaCl stress: Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas Complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology* 126: 1266–1274, 2001.
- Havir, E. A., McHale, N. A.** Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO₂. *Plant Physiol.* 89:952-957, 1989.
- Hazen, S. P., Pathan, M. S., Sanchez, A., Baxter, I., Dunn, M., Estes, B., Chang , H. S., Zhu, T., Kreps. J. A., Nguyen, H. T.** Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Functional and Integrative Genomics* 5: 104-116, 2005.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., Buitink J.** Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6:431–438, 2001.
- Hoshida, H., Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi, Y., Tanaka, A., Takabe, T., Takabe, T.** Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Molecular Biology* 43:103–111, 2000.
- Ifuku, K., Yamamoto, Y., Ono, T. A., Ishihara, S. e Sato, F.** PsbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant Physiol.*139:1175-84. 2005.
- Jiang, M., Zhang, J.** Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta.* 215, 1022–1030, 2002a.

- Jiang, M., Zhang, J.,** Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal Experimental Botany*. 53, 2401–2410, 2002b.
- Kabakov, A. E. e Gabai V. L.** Heat Shock Proteins and Cryoprotection: ATP-Deprived Mammalian Cells. Springer, New York. 1997.
- Keys, A. J., Bird, I. F., Cornelius, M. J., Lea P. J., Wallsgrave, R. M., Mifflin, B. J.** Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275: 741–743, 1978.
- Kovacs, P.** (1973) *Biochem. Wiss. B. Univ. Halle*, 16, 3; citado por **SPITSBERG, V. L. e COSCIA, C. J.** Quinone Reductases of Higher Plants. *Eur. J. Biochem.* 127:67-70, 1982.
- Kozaki, A. e Takeba, G.** Photorespiration protects C3 plants from photo-oxidation. *Nature* 384:557–560, 1996.
- Laemmlli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
- Lam, H-M., Koschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G. M.** The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:569–593, 1996.
- Lea P. J. e Forde, B. G.** The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant Cell Environ* 17: 541–556, 1994.
- Leistner, E.** in *T/7e Biochemistry of Plants* (Conn, E. E. & Stumpf, P. K., eds) vol. 7, Academic Press, New York. 1981.
- Lima, A. L. S., DaMatta, F. M., Pinheiro, H. A., Totola, M. R., Loureiro, M. E.** Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 47, 239-247, 2002.
- Ljungberg, U., Akerlund, H-E., and Andersson, B.** Isolation and characterization of the 10-kDa and 22- kDa polypeptides of higher plant photosystem 2, *Eur. J. Biochem.*, 158:477–482, 1986.
- Mano, J., Torii, Y., Hayashi, S-I, Takimoto, K., Matsui, K., Nakamura, K., Inzé, D., Babiychuk, E., Kushnir, S., e Asada, K.** The NADPH:Quinone Oxidoreductase P1- ζ -crystallin in Arabidopsis Catalyzes the α,β -Hydrogenation of 2-Alkenals: Detoxication of the Lipid Peroxide-Derived Reactive Aldehydes *Plant Cell Physiol.* 43:1445–1455, 2002.

- Mayfield, S. P., Bennoun, P., and Rochaix, J. D.** Expression of the nuclear-encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability in photosystem II particles in *C. reinhardtii*, *EMBO J.*, 6, 313–318, 1987.
- Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V., Aparicio-Tejo, P.** Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194:346-352, 1994.
- Nakano, Y. e Asada, K.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22:867-880, 1981.
- Ono, T-A. e Inoue, Y.** Mn-preserving extraction of 33-, 24- and 16-kDa proteins from O₂-evolving PSII particles by divalent salt-washing, *FEBS Lett.*, 164:255–260, 1983.
- Osmond B., Badger M., Maxwell K. Björkman O. e Leegood R. C.** Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Science* 2:119-121, 1997.
- Park, Y-I., Clow, W. S., Osmond C. B. e Andreson J. M.** Electron transport to oxygen mitigates against photoinactivation of photosystem II *in vivo*. *Photosynthesis Research* 50:23-32, 1996.
- Parsell, D. A., e Lindquist, S.** Heat shock proteins and stress tolerance. In R. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos [eds.], *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, 457–494. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1994.
- Pinheiro, H. A., Da Matta, F.M., Chaves, A. R. M., Batista, K. D., Moraes, G. A. B. K., Loureiro, M. E.** Trocas gasosas, fluorescência da clorofila e status hídrico em clones de *Coffea Canephora* submetidos à seca. In: Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, 3.: 2003, porto Seguro. Anais. Brasília-DF:Emabrapa Café, 80, 2003b.
- Pinheiro, H. A., DaMatta, F. M., Chaves, A. R. M., Fontes, E. P. B., Loureiro, M. E.** Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clone of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Sci.* 167:1307-1314, 2004.
- Priault¹, P., Tcherkez¹, G., Cornic¹, G., De Paepe, R., Naik, R., Ghashghaie¹ J. e Streb¹, P.** The lack of mitochondrial complex I in a CMSII mutant of *Nicotiana sylvestris* increases photorespiration through an increased internal resistance to CO₂ diffusion *Journal of Experimental Botany*, 57:3195–3207, 2006.

- Psenakova, T., Psenak, M., Kovas, P. e Kolek, J.** (1975) *Biologia*, 30,0287-292; citado por **SPITSBERG, V. L. e COSCIA, C. J.** Quinone Reductases of Higher Plants. *Eur. J. Biochem.* 127:67-70, 1982.
- Rakwal, R., Komatsu, S.** Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defence mechanism using proteome analysis. *Electrophoresis* 21: 2491–2500, 2000.
- Rochaix, J.-D. and Erickson, J.,** Function and assembly of photosystem II: genetic and molecular analysis, *Trends Biochem. Sci.*, 13:56–59, 1988.
- Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A. e Siegel, D.** NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact* 129:77 – 97, 2000.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J** Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2: 1131–1145, 2002.
- Sazanov, L.A., Burrows, P., Nixon, P.J.** Detection and characterization of a complex I-like NADH-specific dehydrogenase from pea thylakoids. *Biochem. Soc. Trans.* 24:739–743, 1996.
- Schöffl F., Prändl R. e Reindl A.** Regulation of the heatshock response. *Plant Physiology* 117:1135–1141, 1998.
- Siegel, D. e Ross, D.** Immunodetection of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic Biol Med* 29:246–253, 2000.
- Siegel, D., Franklin, W. A. e Ross, D.** Immunohistochemical detection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in human lung and lung tumors. *Clin Cancer Res* 4:2065–2070, 1998.
- Silva, O. M. e Leite, C. A. M.** Competitividade e custos do café no Brasil e no exterior. In: Zambolim, L. (Ed.), *Café – produtividade, qualidade e sustentabilidade*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 27-48, 2000.
- Smirnoff, N.** Antioxidant systems and plant response to the environment. In: *Environment and plant metabolism – flexibility and acclimation*. Eds Smirnoff, N. BIOS Scientific Publishers, Oxford 217-243, 1995.
- Spetea, C., Hundal, T., Lohmann, F. and Andersson, B.** GTP bound to chloroplast thylakoid membranes is required for lightinduced, multienzyme degradation of the photosystem II D1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6547–6552, 1999.
- Spetea, C., Hundal, T., Lundin, B., Heddad, M., Adamska, I. e Andersson, B.** Multiple evidence for nucleotide metabolism in the chloroplast thylakoid lumen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:1409–1414, 2004.

- Spetea, C., Keren, N., Hundal, T., Doan, J. M., Ohad, I. e Andersson, B.** GTP enhances the degradation of the photosystem II D1 protein irrespective of its conformational heterogeneity at the Q(B) site. *J. Biol. Chem.* 275: 7205–7211, 2000.
- Steponkus, P. L., Cutler, J. M. e O'toole, J. C.** Adaptation to water stress in rice. In: *Adaptation of plants to water and high temperature stress* Eds Turner, N. C. e Kramer, P. J., New York: Wiley Interscience 401-418, 1980.
- Wallsgrove, R. M., Turner, J. C., Hall, N. P., Kendally, A. C., Bright, S. W. J.** Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase-biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol* 83: 155–158, 1987.
- Wang W., Scali M., Vignani R., Spadafora A., Sensi E., Mazzuca S., Cresti M.** Protein for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* 24:2369-2375, 2003.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. e Altman, A.** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response *TRENDS in Plant Science* 9:244-252, 2004.
- Wang, W., Vinocur, B. e Altman, A.** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance 218:1-14, 2003.
- Yamamoto, Y., Ishikawa, Y., Nakatani, E., Yamada, M., Zhang, H. e Wydrzynski, T.** Role of an extrinsic 33 kilodalton protein of photosystem II in the turnover of the reaction centerbinding protein D1 during photoinhibition. *Biochemistry*, 37:1565–1574, 1998.
- Yamamoto, Y., Shinaki, H., Isogai, Y., Matura, K. e Nishimura, M.** Isolation of an Mn-carrying 33 kDa protein from an oxygen-evolving photosystem II preparation by phase partitioning with butanol, *FEBS Lett.*, 175:429–432, 1984.