

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**ADRIANA BROMBINI DOS SANTOS**



**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR  
DA TOLERÂNCIA À SECA E SUA RELAÇÃO COM O  
SISTEMA RADICULAR EM ESPÉCIES DE *Coffea***

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
*Adriana Brombini dos Santos*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia para  
a obtenção do Título de Mestre em Biologia  
Vegetal.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera**

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Sa59c

Santos, Adriana Brombini dos  
Caracterização fisiológica e molecular da tolerância à  
seca e sua relação com o sistema radicular em espécies de  
*Coffea* / Adriana Brombini dos Santos. – Campinas, SP:  
[s.n.], 2009.

Orientador: Paulo Mazzafera.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tolerância à seca. 2. Café. 3. Sistema radicular.  
4. Deidrinas. 5. Aquaporinas. I. Mazzafera, Paulo,  
1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Physiological and molecular characterization of drought tolerance and its relation with the root system in *Coffea* species.

**Palavras-chave em inglês:** Drought tolerance; Coffee; Root system; Dehydrins; Aquaporins.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Paulo Mazzafera, Michel Georges Albert Vincentz, Marília Gaspar.

**Data da defesa:** 04/08/2009.

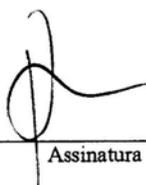
**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal.

## COMPOSIÇÃO DA BANCA

**Data da defesa: 04/08/2009**

### **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Paulo Mazzafera (Orientador)**



---

Assinatura

**Dra. Marília Gaspar**



---

Assinatura

**Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincetz**



---

Assinatura

**Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira**

---

Assinatura

**Dr. Pierre Roger Rene Marraccini**

---

Assinatura

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Maria e Isaias, pelo esforço e confiança*  
*Ao meu esposo, Caio, pelo amor, compreensão e incentivo*  
*E, especialmente, à minha filha, Giovanna, pelo carinho e companheirismo.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Universidade Estadual de Campinas, especialmente ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pela orientação e confiança dedicada à realização deste trabalho.

Aos colaboradores do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Dra. Maria Bernadete Silvarolla, pelo fornecimento das sementes de café e ao Dr. Rafael Vasconcelos e equipe, especialmente aos alunos Daniela e Ricardo, pela colaboração e auxílios prestados nas análises de potencial hídrico em meio de cultura.

Aos funcionários Dulce, Néia, Denise, Vanessa, Luciano e demais membros do Depto. de Biologia Vegetal, pelo auxílio e amizade.

Ao Dr. Milton Massao Shimizu pelas orientações e auxílio e à Dra. Sara Adrian pela ajuda com as análises estatísticas.

À Pissardi Ind. e Com. de Artefatos Plásticos Ltda. pela doação dos vasos (citrovasos).

A todos os colegas do depto., em especial, Luciana Menolli, Ísis, Lucas, Sarinha e Rafael, pela amizade, conversas e pelos divertidos almoços no restaurante universitário.

Ao meu esposo e à minha querida filha, pelo apoio e compreensão nos momentos em que estive ausente.

À amiga Letícia, por incontáveis demonstrações de apoio e amizade.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Importância da água para as plantas.....	1
1.2. Potencial hídrico.....	1
1.3. A seca.....	2
1.4. Tolerância à seca.....	3
1.5. Efeitos da seca na cafeicultura.....	8
1.6. Tolerância à seca em <i>Coffea</i> .....	10
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Análise e identificação de genes em <i>Coffea</i> relacionados ao estresse hídrico.....	15
3.1.1. O banco EST-Genoma Café: uma ferramenta para a descoberta de genes.....	15
3.1.2. Árvore filogenética.....	16
3.2. Estudos com células em suspensão.....	16
3.2.1. Indução de calos e estabelecimento da suspensão celular de café.....	16
3.2.2. Inóculo, tratamento e coleta das células.....	17
3.2.3. Análise de expressão gênica.....	18
3.2.4. Determinações bioquímicas.....	20
3.3. Estudos com plantas de café.....	21
3.3.1. Material vegetal e tratamento de estresse hídrico.....	21
3.3.2. Experimento I: Caracterização da murcha foliar e determinação do potencial hídrico.....	22
3.3.3. Experimento II: Tolerância à seca em <i>Coffea</i> .....	23
3.3.4. Experimento III: Caracterização do sistema radicular.....	25
3.3.5. Estatística.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Análise e identificação <i>in silico</i> de genes relacionados ao estresse hídrico em <i>Coffea</i> .....	26
4.1.1. Deidrininas.....	26
4.1.2. Aquaporinas.....	33
4.2. Ensaio de estresse hídrico em suspensão celular de café cv. Catuaí Vermelho.....	42
4.2.1. Determinação do potencial hídrico no meio de cultura.....	42
4.3. Análises de expressão: Northern eletrônico e RT-PCR semiquantitativa.....	43
4.3.1. Deidrininas.....	43
4.3.2. Aquaporinas.....	49
4.4. Caracterização da tolerância à seca em plantas de <i>Coffea</i> .....	55
4.4.1. Experimento I: Caracterização da murcha foliar em cafeeiros e sua correlação com o potencial hídrico.....	56
4.4.2. Experimento II: Avaliação da tolerância à seca em cafeeiros.....	59
4.4.3. Experimento III: Caracterização do sistema radicular de cafeeiros irrigados.....	63
4.5. Análises Bioquímicas.....	65
4.5.1. Análise de açúcares solúveis totais, sacarose, aminoácidos livres totais e prolina.....	65
4.5.2. Análise qualitativa de aminoácidos por HPLC.....	70
5. CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

## RESUMO

Plantas das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo de *Coffea arabica* L. e da cultivar Apoatã de *C. canephora* Pierre ex Froehner, e plantas de Mundo Novo enxertadas sobre Apoatã foram avaliadas quanto a possíveis estratégias utilizadas para suportar a baixa disponibilidade de água no solo. Em paralelo, foi conduzido um ensaio com suspensões celulares de Catuaí Vermelho sob estresse osmótico induzido por PEG. Assim, este estudo teve por objetivo examinar alguns mecanismos de tolerância à seca em café através da avaliação de aspectos morfológicos (sistema radicular), fisiológicos (ajuste osmótico) e moleculares (expressão de deidrininas e aquaporinas) em plantas jovens e cultura de células. A análise de expressão do gene *CaDh1* (deidrina) em suspensão celular de café tratada com PEG (15% m/v), por 8, 24 e 72 h, mostrou aumento na atividade sob estresse osmótico, o que poderia estar associado a um possível mecanismo de proteção de membranas e macromoléculas contra a dessecação. Não foi verificada alteração na resposta dos genes *PIP1*, *PIP2* e *TIP1* (aquaporinas) sob condição de estresse nas células de café. Plantas de café cultivadas em vasos (4,0 L) foram submetidas a estresse hídrico moderado por suspensão da irrigação, sob condições de casa de vegetação, até que o potencial hídrico da folha no “predawn” atingisse cerca de -2,0 MPa. Verificou-se que as taxas de crescimento nos genótipos de café arábica, avaliada pelo acúmulo de biomassa total (folhas e raízes), foram intensamente afetadas pela seca, com redução em torno de 26,5% em Catuaí e 29,0% em Mundo Novo. Por outro lado, as plantas enxertadas não apresentaram redução significativa de crescimento em relação às plantas irrigadas, sugerindo uma contribuição positiva da enxertia para melhorar a eficiência na captação de água pelo porta-enxerto Apoatã, sob condição de baixa disponibilidade de água no solo. O conteúdo de açúcares solúveis totais nas folhas das plantas irrigadas foi maior que o observado para as plantas sob déficit hídrico. A maior redução foi constatada entre os genótipos de café arábica (23,0% em Catuaí e 43,8% em Mundo Novo), enquanto as reduções em Apoatã e MN/Apoatã não foram significativas. Verificou-se maior acúmulo de aminoácidos totais nas folhas e raízes de plantas de Catuaí sob estresse hídrico comparado a Mundo Novo. Apoatã e MN/Apoatã não mostraram aumentos significativos em relação às respectivas plantas irrigadas. Em todos os genótipos analisados, os teores de prolina (Pro) nas folhas e raízes de plantas sob estresse foram aumentados e, nas raízes, esse acúmulo foi bastante acentuado, sendo 6 vezes maior nos genótipos de café arábica, 4 vezes em Apoatã e 16 vezes na enxertia MN/Apoatã em relação às plantas irrigadas.

Entretanto, tais aumentos não parecem estar diretamente associados a maiores graus de tolerância à seca em café. Os conteúdos dos aminoácidos asparagina (Asn), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Gaba), glutamato (Glu) e alanina (Ala) também foram alterados, observando-se, de modo geral, aumento nos teores de Asn e Gaba e redução de Glu e Ala nas folhas e raízes das plantas sob estresse. Em conclusão observou-se que os genótipos com sistema radicular mais vigoroso como Apatã e Catuaí foram menos afetados pela seca, provavelmente porque foram mais hábeis em explorar o perfil do solo para a captação de água.

## SUMMARY

Seedlings of the cultivars Catuaí Vermelho and Mundo Novo of *Coffea arabica* L., of the cultivar Apatã of *C. canephora* Pierre ex Froehner, and plants of Mundo Novo grafted on Apatã were evaluated for possible strategies to withstand low water availability in the soil. In parallel, an assay with cellular suspension culture (Catuaí Vermelho) was carried out under osmotic stress induced by PEG. Thus, this study aimed to examine morphological (root systems), physiological (osmotic adjustment) and molecular (expression of dehydrins and aquaporins) traits in coffee plants and coffee cell suspension cultures as possible mechanisms of drought tolerance. The expression analysis of *CaDh1* (dehydrin) in coffee cell suspensions grown with PEG (15% w/v) for 8, 24 and 72 h, showed an increase in activity under osmotic stress indicating a possible protection mechanism against desiccation. No changes were observed in the response of *PIP1*, *PIP2* and *TIP1* genes (aquaporins) under stress condition in coffee cells. Under greenhouse conditions, coffee seedlings were cultivated in 4.0 L pots submitted to moderate drought stress by suspending irrigation until leaf water potential at predawn reach about -2.0 MPa. Among the genotypes of arabica coffee subjected to water stress there was reduction in total dry weight, around 26.5% in Catuaí and 29.0% in Mundo Novo when compared with irrigated control plants. On the other hand, the grafted plants were not affected, suggesting a positive contribution of the grafting due to bigger efficiency in the water acquisition by the rootstock Apatã under low water availability in the soil. The content of total soluble sugars was greater in leaves of irrigated plants than plants under water stress. The greatest reduction was verified among the genotypes of arabica coffee (23.0% in Catuaí and 43.8% in Mundo Novo) while the reduction in Apatã and MN/Apatã was not statistically significant. The accumulation of total amino acids was higher in leaves and roots of water stressed Catuaí than Novo Mundo. Apatã and MN/Apatã did not show significant increase in the content of amino acids in relation to irrigated control plants. In all genotypes, water stress induced an increase in the levels of proline (Pro) in leaves and roots. In the roots this increased was about 6 times in the genotypes of arabica coffee, 4 times in Apatã and 16 times in the grafting MN/Apatã in relation to irrigated control plants. However this increase in the levels of Pro does not seem to be directly associated to higher degrees of drought tolerance in coffee. The content of amino acids asparagine (Asn),  $\gamma$ -aminobutyric acid (Gaba), glutamate (Glu) and alanine (Ala) was also changed in the leaves and roots of stressed plants. In general, there was increase in levels of Asn and Gaba while was observed reduction in

content of Glu and Ala. In conclusion it was found that the genotypes with more vigorous root system as Apatã and Catuaí were less affected by drought, probably because they were more efficient in exploring the soil profile for the water absorption.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Importância da água para as plantas**

A água é o principal constituinte das plantas podendo representar de 50 a 95% da massa fresca total dos diferentes órgãos e tecidos vegetais, embora certas sementes de oleaginosas possuam conteúdo bastante reduzido, entre 5 – 7% (Larcher, 2003).

A água é essencial para a manutenção dos processos fisiológicos e está relacionada a diversas funções como estrutura, crescimento e transporte, além de funcionar como um solvente ideal para as reações químicas nas células. Desta maneira, ela desempenha papel fundamental dissolvendo grandes quantidades de íons, gases como O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e metabólitos (açúcares, aminoácidos e proteínas); funcionando como meio de transporte para carboidratos, nutrientes e fito-hormônios indispensáveis ao metabolismo da planta; exercendo pressão de turgescência contra as paredes celulares para promover a expansão celular (crescimento) e regulando a temperatura das superfícies foliares (Larcher, 2003; Pérez, 2006).

Assim, toda planta necessita manter um balanço entre a absorção e a perda de água, o que se constitui em um sério desafio para as plantas terrestres. Pela importância que assume para a sobrevivência das plantas, a água é um fator limitante e sua indisponibilidade pode acarretar sérios danos ao crescimento, desenvolvimento e produtividade vegetal, sejam em ambientes naturais ou na agricultura.

## **1.2. Potencial hídrico**

O gradiente de potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) entre o solo e as raízes, e destas com os vários compartimentos da planta (folhas, frutos etc) governa o deslocamento da água do solo até a atmosfera, atravessando todo o corpo do vegetal. Tal caminho percorrido pela água é denominado contínuo solo-planta-atmosfera.

O  $\Psi_w$  é matematicamente descrito como o potencial químico da água dividido pelo volume molar parcial da água (Kramer & Boyer, 1995). Os principais fatores que influenciam o  $\Psi_w$  nas plantas são concentração, pressão e gravidade, podendo ser o mesmo decomposto em função de seus componentes individuais e expresso nos seguintes termos:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g$$

Os termos  $\Psi_s$ ,  $\Psi_p$  e  $\Psi_g$  indicam, respectivamente, o potencial osmótico ou de soluto, o potencial de pressão ou pressão hidrostática e o potencial gravitacional. Em situações particulares, onde se consideram solos bastante secos, sementes e paredes celulares é comum a referência a outro componente do  $\Psi_w$ , o potencial matricial ( $\Psi_m$ ) (Taiz & Zeiger, 2004).

As células das plantas mantêm uma concentração interna de solutos em torno de 0,5 a 1,0 molal, maior que externamente, favorecendo a entrada da água na célula (Larcher, 2003). À medida que a água entra na célula, a parede celular sofre distensão induzida pelo aumento do volume do protoplasto e desenvolve uma força de resistência em sentido contrário, o potencial de pressão ( $\Psi_p$ ). Como consequência da entrada de água na célula, o  $\Psi_w$  tende a aumentar e a diferença entre os potenciais hídricos interno e externo se reduz, até que o equilíbrio seja atingido, isto é,  $\Delta\Psi_w = \Psi_{w(\text{interno})} - \Psi_{w(\text{externo})} = 0$  MPa e o transporte cessa.

### **1.3. A seca**

Sob condições naturais, a seca pode ser definida com um período mais ou menos prolongado sem chuvas. Contudo, Passioura (1996) pondera que essa definição indica apenas uma visão purista e meteorológica do termo, referindo-se a um período no qual a evapotranspiração supera a precipitação, propondo que a seca deve ser entendida como uma circunstância na qual a planta sofre redução de crescimento e/ou produtividade devido a um aporte insuficiente de água.

O estado hídrico das plantas naturalmente sofre alterações ao longo do dia, influenciado por processos como absorção de água e transpiração, de modo que sob condições moderadas de temperatura, nas primeiras horas do dia, a absorção de água pelas raízes é maior que a transpiração e as plantas apresentam um balanço positivo. No período compreendido entre as 10 – 16 h, devido a temperaturas mais elevadas, essa relação inverte-se e a transpiração pode superar a absorção, levando as plantas a um balanço hídrico negativo. Para evitar os danos decorrentes da perda excessiva de água, as plantas promovem o fechamento parcial ou total de seus estômatos. Posteriormente, no final da tarde e durante a noite, sob temperaturas mais amenas, as plantas recuperam seu estado de turgescência, voltando a exibir balanço positivo (Larcher, 2003).

Contudo, quando as plantas são submetidas a uma condição de baixa disponibilidade de água como, por exemplo, durante um período de seca, o balanço hídrico tenderá a tornar-se progressivamente mais negativo, de forma que o processo de desidratação acarretado pela redução na absorção de água poderá atingir um estado irreversível, denominado ponto de murcha permanente, podendo levar as plantas à morte por dessecação (-1,5 MPa é o ponto de murcha permanente para o grupo das mesófitas) (Taiz & Zeiger, 2004).

Assim, a seca afeta diretamente o status da água no solo, aumentando a resistência ao fluxo da água e, conseqüentemente, dificultando sua absorção pelas raízes. Desse modo, a seca constitui um dos estresses abióticos de maior impacto para as plantas, seja em ambientes naturais ou na agricultura, induzindo diversas alterações metabólicas nos níveis fisiológicos, bioquímicos e moleculares.

#### **1.4. Tolerância à seca**

De acordo com Mitra (2001), a tolerância à seca pode ser definida como a habilidade da planta em suportar o déficit hídrico sob baixo  $\Psi_w$  nos tecidos.

O estresse por déficit hídrico implica em importante alteração na expressão gênica, iniciada pela percepção do sinal primário (mudança no turgor celular, conforme sugerido por alguns trabalhos), seguida pela transdução do sinal mediada por mensageiros secundários (principalmente  $\text{Ca}^{2+}$ ) podendo ser regulada pela via ABA dependente e/ou independente (Khurana *et al.*, 2008). A regulação da transcrição durante o estresse hídrico envolve a participação de importantes fatores regulatórios como os elementos-*cis* ABRE (ABA-responsive element) e DRE (dehydration-responsive element) via ABA-independente (Khurana *et al.*, 2008), além de fatores de transcrição induzíveis por estresse como os genes NAC que regulam a resposta contra a desidratação em *Arabidopsis thaliana* (Trans *et al.*, 2004).

A adaptação das plantas ao estresse envolve a manutenção da homeostase celular, detoxificação de compostos nocivos e alterações no crescimento. Neste sentido, as plantas terrestres evoluíram uma série de mecanismos para tolerar a falta de água. Estes mecanismos são recrutados em função do tempo de duração e da intensidade do estresse e processam-se nos variados níveis de complexidade: morfológicamente, através da redução da área foliar e do aumento do sistema radicular (volume e/ou profundidade); fisiologicamente, por meio de estratégias como o fechamento estomático, o ajuste osmótico, maior eficiência no uso da água (EUA), ativação do sistema antioxidante, absorção e fixação noturna de  $\text{CO}_2$  (plantas CAM, *Crassulacean Acid Metabolism*); e, molecularmente, pela expressão diferencial de genes, tais como as proteínas LEA (*L*ate *E*mbryogenesis *A*bundant) e enzimas antioxidantes (função protetora), proteínas canal de água (aquaporinas) e de síntese de osmólitos compatíveis (controle do balanço hídrico na célula) e enzimas de síntese de componentes da parede celular (extensibilidade da parede e crescimento celular), entre outros (Hopkins, 1999; Taiz & Zeiger, 2004). Alguns destes mecanismos foram investigados por nosso estudo em café e são destacados a seguir.

**Aumento do sistema radicular:** A razão da biomassa de raízes e a parte aérea parece ser governada por um balanço funcional entre a absorção de água pelas raízes e a fotossíntese pela parte aérea. De acordo com Taiz & Zeiger (2004), sob condições normais de crescimento a parte aérea funciona como o principal dreno de fotoassimilados; contudo, quando a planta está submetida ao déficit hídrico, as raízes passam a receber uma maior proporção de assimilados, uma vez que a demanda energética da parte aérea é diminuída devido à inibição da expansão foliar. Estudos têm mostrado que, freqüentemente, plantas adaptadas à seca são caracterizadas por um sistema radicular profundo e vigoroso (Ramos & Carvalho, 1997; Pinheiro *et al.*, 2004, 2005). Sob estresse moderado, a inversão na relação fonte-dreno favorece o crescimento do sistema radicular que, desta maneira, aprofunda suas raízes rumo às camadas mais inferiores e úmidas do solo.

**Ajuste osmótico:** É um mecanismo usado pelas plantas para promover a manutenção do turgor e reduzir os efeitos deletérios acarretados pelo estresse hídrico sobre os tecidos vegetais (Flowers *et al.*, 1991). O ajuste osmótico consiste no aumento líquido do conteúdo de soluto por célula, independentemente das mudanças de volume resultantes da perda de água, de modo que o  $\Psi_s$  pode ser reduzido em aproximadamente 1,0 MPa, favorecendo a entrada da água na célula (Taiz & Zeiger, 2004).

Os solutos ou osmólitos compatíveis são, em sua maioria, compostos orgânicos de baixa massa molecular e não-tóxicos tais como aminoácidos, principalmente prolina, açúcares, alcoóis de açúcar (sorbitol e manitol) e glicina betaína (Meneses *et al.*, 2006), além de certos íons inorgânicos como  $K^+$ . Sob estresse osmótico estas moléculas concentram-se predominantemente no citoplasma promovendo aumento na retenção de água e a manutenção do turgor celular. Além dessa função, os solutos poderiam atuar na estabilização de macromoléculas (lipídeos e proteínas) prevenindo a desintegração das membranas e na

proteção contra danos oxidativos (Yeo, 1998; Zhang *et al.*, 1999). O acúmulo dos solutos compatíveis não interfere no metabolismo celular (Chen & Murata, 2002).

Alguns estudos têm procurado estabelecer correlações positivas entre o ajuste osmótico e a produtividade de plantas cultivadas sob déficit hídrico e, neste sentido, diversas abordagens de engenharia genética (transgênicos), mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) e melhoramento convencional apontam a manipulação do ajuste osmótico e seus componentes como um efetivo mecanismo de tolerância à seca (Morgan & Condon, 1986; Ludlow *et al.*, 1990; Rodríguez-Maribona *et al.*, 1992; Morgan, 1995; Blum, 1996; Subbarao *et al.*, 2000; Moinuddin *et al.*, 2005).

Contudo, autores como Serraj & Sinclair (2002) contestam o real efeito do ajuste osmótico no aumento da produtividade das culturas, considerando que ainda são poucos os estudos que suportam essa hipótese e que, na maior parte deles, as estimativas são baseadas em situações de estresse hídrico muito severo e de baixa produção.

**Proteínas LEA:** Foram originalmente descritas em sementes de algodão como proteínas que se acumulavam durante o último estágio da embriogênese (Baker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989). Todas as proteínas LEA são caracterizadas por elevado conteúdo de glicina, alto caráter hidrofílico e baixo nível de organização estrutural (Close, 1996; Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Foram definidos três grandes grupos com base na similaridade de seqüência (regiões conservadas) e características estruturais: grupo 1, grupo 2 e grupo 3 (Bray, 1993).

As deidrininas são um subgrupo do grupo 2 ou família D-11 das proteínas LEA (Dure, 1993; Close, 1996; Ingram & Bartels, 1996). São caracterizadas por uma ou mais seqüências consensos altamente conservadas de 15 aminoácidos (EKKGIMDKIKEKLPG) ricas em resíduos de lisina e denominadas segmentos K, os quais se especulam que poderiam formar  $\alpha$ -hélices anfipáticas (Dure, 1993; Close, 1996).

A expressão das deidrinhas tem sido associada a uma possível ação protetora contra a dessecação, uma vez que tais proteínas tendem a se acumular nos tecidos de plantas submetidas a estresse osmótico e durante o desenvolvimento da semente (Close, 1996; Ingram & Bartels, 1996; Lopez *et al.*, 2003).

Embora os mecanismos estruturais e fisicoquímicos envolvidos no funcionamento dessas proteínas contra o estresse osmótico *in vivo* sejam desconhecidos (Hinniger *et al.*, 2006), estudos recentes têm sugerido que elas poderiam associar-se fortemente às moléculas de água (peptídeos hidrofílicos) ou a outras moléculas, evitando assim processos como a cristalização de proteínas, além de outros danos celulares (Close, 1996; Koag, *et al.*, 2003). De acordo com Xu *et al.* (1996), a expressão do gene HVA1 (membro do grupo 3 das proteínas LEA descrito em *Hordeum vulgare* L.) conferiu tolerância aos estresses hídrico e salino em plantas de arroz transgênicas, resultados estes que reforçam o potencial das proteínas LEA como ferramenta molecular para o melhoramento genético, visando tolerância a diversos tipos de estresse.

***Aquaporinas***: Constituem um grupo de proteínas canais que atuam no transporte de água e/ ou pequenos solutos neutros (uréia, ácido bórico, ácido salicílico) ou gases (amônia, dióxido de carbono) através de membranas (Tyerman *et al.*, 2002; Maurel *et al.*, 2008). As aquaporinas facilitam a difusão da água exercendo um fino controle do fluxo de água intra e intercelular nas plantas (Maurel *et al.*, 1997). Pertencem a uma superfamília de proteínas denominadas MIPs (*Major Intrinsic Proteins*), as quais estão presentes em todos os tipos de organismos, incluindo bactérias, animais e plantas (Jang *et al.*, 2004). Essas proteínas exibem tipicamente uma estrutura conservada com 6 domínios transmembrana ligados por 3 “loops” extra e 2 “loops” intracelulares, sendo que as regiões N- terminal e C-terminal estão imersas no citosol (Fujiyoshi *et al.*, 2002). As aquaporinas possuem seqüências-box NPA (Asn-Pro-Ala)

conservadas e geralmente organizam-se em tetrâmeros, de modo que cada monômero atua como um poro funcionalmente independente na membrana da célula (Luu & Maurel, 2005).

Nas plantas as aquaporinas apresentam-se sob múltiplas isoformas. Em *Arabidopsis thaliana* foram caracterizados 35 membros e uma diversidade similar é prevista para outras espécies de plantas (Chaumont *et al.*, 2001; Johanson *et al.*, 2001). Com base no genoma de *A. thaliana*, as MIPs foram subdivididas em 4 classes homólogas que indicam a localização sub-celular e características estruturais nas regiões N-terminal e C-terminal: PIP (Plasma Membrane Intrinsic Protein), TIP (Tonoplast Intrinsic Protein), NIP (Nodulin-26-like Intrinsic Protein) e SIP (Small basic Intrinsic Protein), cada uma delas com divisões internas (Schäffner, 1998; Heymann & Engel, 1999; Chaumont *et al.*, 2001; Johanson *et al.*, 2001).

O estresse hídrico parece influenciar fortemente a expressão dos genes MIP. Com efeito, vários genes MIP foram identificados a partir de bibliotecas de cDNA de tecidos sob déficit hídrico (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992; Mariaux *et al.*, 1998). Embora a relação entre estresse e regulação dos genes MIP ainda não seja bem compreendida, autores como Maurel (1997) sugerem que os mecanismos de tolerância à seca poderiam envolver a participação dessas proteínas. Adicionalmente, Lian *et al.* (2004) estudaram uma proteína PIP de arroz (RWC3), cuja expressão é induzida por alterações osmóticas, especificamente em uma cultivar de arroz tolerante à seca e verificaram que a superexpressão desse gene em uma cultivar sensível, sob o controle de um promotor estresse-induzível, foi capaz de melhorar o desenvolvimento da planta transgênica sob condições de estresse.

### **1.5. Efeitos da seca na cafeicultura**

O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae e das cerca de 90 espécies já descritas para o gênero, apenas duas – *C. arabica* L. (café arábica) e *C. canephora* Pierre ex Froehner (café robusta) – dominam economicamente o comércio mundial de café, contribuindo com

62% e 38% da produção total, respectivamente (DaMatta & Ramalho, 2006).

O café é a mais importante ‘commodity’ agrícola mundial, movimentando mais de 90 bilhões de dólares/ano e envolvendo cerca de 500 milhões de pessoas em sua cadeia produtiva, do cultivo ao produto final para o consumo (Rezende & Rosado, 2004). É cultivado em mais de 80 países nos quatro continentes, incluindo Uganda, Burundi, Ruanda e Etiópia (África) que têm o café como seu principal produto no comércio exterior (Willson, 1999). O Brasil é o maior produtor e exportador de café, com participação média de 24% nas exportações mundiais (Saes & Nakazone, 2004).

A seca constitui o principal fator climático causador de estresse no cafeeiro, podendo não somente afetar a disponibilidade de água para a planta como também a absorção de nutrientes. O efeito na sobrevivência e/ou produtividade da planta é proporcional ao tempo de duração da estiagem, isto é, quanto maior o tempo, maior também será o dano fisiológico para a planta, o que implicará, por sua vez, em menor produção líquida (DaMatta & Ramalho, 2006). Já se teve registro de que em regiões produtoras onde a irrigação era ausente, a produção de café teve quebra de até 80% na safra em anos de seca prolongada.

Embora a produção de café seja fortemente afetada pela seca, uma parcela substancial da safra mundial é produzida por pequenos proprietários em regiões freqüentemente sujeitas a períodos de estiagem, onde o emprego da irrigação é uma condição rara (DaMatta & Ramalho, 2006). No Brasil, a situação é semelhante e a irrigação é parcialmente empregada em alguns dos estados produtores (BA, MG e ES), quando a topografia desfavorável ou os elevados custos da técnica não inviabilizam o seu uso.

Em anos recentes, a cafeicultura brasileira sofreu um processo de expansão para regiões marginais, tais como o cerrado mineiro e o oeste baiano, antes consideradas pouco aptas ao desenvolvimento da cultura (Silva & Mazzafera, 2008). Paralelamente, surgiram novos desafios relativos à menor disponibilidade hídrica, em grande parte devido à má

distribuição das chuvas ao longo do ano, além de temperaturas mais elevadas, impondo grandes limitações climáticas à produção do café (Silva & Mazzafera, 2008).

O processo de expansão da cafeicultura para regiões marginais do país associado a um cenário de mudanças climáticas deverá impor grandes limitações à produção do café. Segundo Alègre (1959, citado por Silva & Mazzafera, 2008), a temperatura média anual ótima para o café arábica situa-se entre 18 – 21°C. Acima de 23°C os processos de desenvolvimento e amadurecimento dos frutos são acelerados, freqüentemente levando a uma perda na qualidade da bebida (Camargo, 1985). Dessa maneira, a identificação e a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na tolerância à seca são de fundamental importância para o melhoramento e a seleção de cultivares mais tolerantes de *Coffea*.

#### **1.6. Tolerância à seca em *Coffea***

Os mecanismos fisiológicos associados à tolerância no gênero *Coffea* parecem estar fortemente relacionados à grande sensibilidade estomática induzida pelo déficit hídrico no solo (Carr, 2001; Pinheiro *et al.*, 2005) ou na atmosfera (Barros *et al.*, 1997; Pinheiro *et al.*, 2005), aspecto este diretamente relacionado aos centros de origem das espécies de café, situados nas florestas tropicais da África. *C. arabica* é nativo dos sub-bosques das florestas de terras altas da Etiópia (1600-2800 m de altitude), onde as temperaturas apresentam pouca variação sazonal (15-20°C). Nesta região, as chuvas são bem distribuídas e variam de 1600-2000 mm, com uma estação seca com duração média de 3-4 meses (Silva & Mazzafera, 2008). Por sua vez, *C. canephora* é predominante nas florestas de terras baixas da bacia do Rio Congo, na região de Uganda, com altitudes que variam desde o nível do mar até 1200 m. A temperatura média situa-se entre 24-26°C e as chuvas são bastante abundantes (acima de 2000 mm), distribuindo-se por um período de 9-10 meses (Coste, 1992).

Com efeito, a condutância estomática ( $g_s$ ) em cafeeiro arábica parece constituir um indicador bastante precoce da falta de água, mostrando reduções imediatas tão logo um terço do aporte de água no solo decaia (Nunes, 1976). Ao contrário, cafeeiros robusta parecem exibir um baixo controle estomático da transpiração (DaMatta *et al.*, 1997). Estudo desenvolvido por Fahl *et al.* (2001a) demonstrou que o controle da abertura estomática na cv. Apatã de *C. canephora*, via sinais químicos da raiz, foi menos responsivo à redução da água no solo do que arábica. Possivelmente essas variações remontam às origens das duas espécies, pois enquanto arábica derivou de uma região com uma estação seca duradoura (4 a 5 meses/ano) e umidade atmosférica relativamente baixa, robusta evoluiu em típico clima tropical, com chuvas abundantes e bem distribuídas ao longo de 9-10 meses e umidade próxima da saturação (Willson, 1999).

O ajuste osmótico é uma estratégia largamente empregada pelas plantas para promover a manutenção do turgor celular e tem sido intensamente investigada como possível mecanismo de tolerância à seca. A contribuição dos solutos compatíveis tais como prolina e compostos quaternários de amônio em *Coffea* foi observada em magnitudes inferiores a 0,3 MPa (raramente superior a 0,5 MPa) e, desta forma, não tem demonstrado correlação satisfatória com tolerância à seca (Meinzer *et al.*, 1990; DaMatta *et al.*, 1993). O acúmulo de solutos compatíveis pode contribuir na conservação do volume protoplasmático, contudo em condição de estresse a manutenção de um alto conteúdo relativo de água é mais importante que o ajuste osmótico *per se* para conferir resistência à seca em cafeeiros (DaMatta *et al.*, 1993).

De acordo com Maestri *et al.* (1995), em várias cultivares de café arábica e robusta, o acúmulo desses compostos sob condições de déficit hídrico não parece ser um indicador suficientemente sensível do status de água na folha. Mazzafera & Teixeira (1989) sugeriram que o acúmulo de prolina verificado em plantas de café arábica submetidas a estresse hídrico poderia estar mais relacionado com as injúrias impostas pela limitação hídrica do que com um

possível mecanismo de defesa contra o estresse por seca.

Plantas adaptadas à seca geralmente são caracterizadas por um sistema radicular profundo e vigoroso. Nesse sentido, diversos trabalhos utilizando a enxertia de cultivares de café arábica sobre robusta cv. Apatã (do tupi-guarani, “raízes fortes”) têm evidenciado taxas de crescimento e produção superiores às de plantas não enxertadas em solos livres de nematóides (Fahl & Carelli, 1985; Fahl *et al.*, 1998, 2001a; Alfonsi *et al.*, 2005). O melhor desempenho das plantas enxertadas foi atribuído à maior capacidade de exploração do perfil do solo em volume e profundidade, além de maior eficiência na captação de água em períodos de déficit hídrico, mantendo maiores taxas fotossintéticas e maior ganho de carbono (Fahl *et al.*, 2001b). Estudo desenvolvido em café robusta por Pinheiro *et al.* (2005) apontou que a profundidade da raiz poderia ser associada a um melhor desempenho dos clones tolerantes à seca (14 e 120) em relação aos clones sensíveis (46 e 109A), em condições de limitação de água.

Estudos recentes têm investigado a participação do sistema antioxidante em cafeeiros e sua possível correlação com tolerância à seca. Lima *et al.* (2002) propuseram que a tolerância à seca em café robusta poderia estar parcialmente associada ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase). Resultados obtidos por Menezes (2005) com clones de *C. canephora* reforçaram essa proposição, indicando que o clone tolerante exibiu aumento significativo da atividade de superóxido dismutase, enquanto no clone sensível ela não foi detectada.

As evidências reforçam a existência de uma grande variabilidade genética relativa à tolerância à seca em *Coffea*, inclusive intra-específica. Estudos baseados na caracterização de isoenzimas identificaram 2 grandes grupos em *C. canephora*: o Guineano (Kouilou), originário da Guiné e da Costa do Marfim e o Congolês (Robusta), com origem na África Central, que compreende dois subgrupos distintos quanto ao grau de tolerância à seca: SG1

(tolerante) e SG2 (sensível) (Montagnon *et al.*, 1998).

Conforme foi discutido, vários aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos parecem possuir correlações, em menor ou maior escala, com os possíveis mecanismos determinantes da tolerância à seca em café. Aparentemente, o maior componente de adaptação diferencial à seca entre os cafés arábica e robusta parece ser comportamental, relacionado às taxas de uso da água ou eficiência na extração de água do solo (Meinzer *et al.*, 1990; DaMatta *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2007).

Embora atualmente o uso da genômica para o estudo da tolerância à seca em café seja incipiente, novas fronteiras abertas pela biologia molecular devem contribuir muito para a melhor compreensão dos mecanismos de tolerância em *Coffea*, o que deverá ser potencializado pelo projeto EST-Genoma Café (Vieira *et al.*, 2006), que produziu cerca de 130.000 etiquetas de seqüências expressas. Novos conhecimentos gerados pelo uso das ferramentas moleculares certamente poderão contribuir grandemente para com os programas de melhoramento do café, especialmente considerando as novas tendências de expansão da cafeicultura brasileira para áreas de menor disponibilidade hídrica.

## 2. OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivos:

Geral: estudar possíveis mecanismos de tolerância à seca em café sob aspectos fisiológicos e moleculares, utilizando cultura de células e plantas jovens.

Específicos: a) analisar a expressão diferencial de deidrinas e aquaporinas em suspensão celular de café sob condição de estresse hídrico; b) avaliar o papel do ajuste osmótico e sua real contribuição como mecanismo de tolerância à seca em cafeeiros; c) caracterizar o sistema radicular de diferentes genótipos de café correlacionando-os com estratégias de tolerância à seca e d) verificar a contribuição da enxertia para melhorar o desempenho das plantas de café arábica sob condição de déficit hídrico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Análise e identificação de genes em *Coffea* relacionados ao estresse hídrico

##### 3.1.1. O banco EST-Genoma Café: uma ferramenta para a descoberta de genes

A identificação de possíveis genes cuja expressão pudesse estar correlacionada a tolerância à seca em café foi realizada através da busca de sequências gênicas disponíveis no banco EST-Genoma Café (Vieira *et al.*, 2006).

O Projeto EST-Genoma Café foi iniciado em 2002 por meio de um acordo cooperativo entre o Consórcio Brasileiro para Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), um consórcio nacional envolvendo 40 universidades públicas e institutos de pesquisa, a EMBRAPA, a FAPESP e o UNIEMP. O projeto constitui-se em uma ferramenta útil para a descoberta de genes e análise genética funcional em café e espécies relacionadas, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre a estrutura e a evolução do genoma do café. Os resultados relativos à anotação das seqüências estão armazenados em uma base de dados “on line” (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/café>) de acesso restrito. Neste banco constam informações sobre genes expressos na forma de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de 3 espécies de café: *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* (Vieira *et al.*, 2006). Deve-se ressaltar que além das bibliotecas produzidas dentro desse projeto, o banco contém ainda as informações referentes aos dados gerados pelo projeto genoma *C. canephora* do grupo Cornell-Nestlé, que produziu aproximadamente 47000 ESTs, tendo como foco principal o desenvolvimento de frutos/sementes do café (Lin *et al.*, 2005).

Duas famílias de genes foram eleitas para este estudo: deidrinas (Dhs) e aquaporinas (AQPs). Utilizando as palavras-chave “dehydrin” e “aquaporin” foram realizadas as buscas para as 3 espécies de café do banco. Sequências com “e-value” maior que  $1e^{-5}$  foram “clusterizadas” (Phrap ou CAP3), analisadas quanto à qualidade de suas bases (phred > 20) e

corrigidas manualmente. As sequências consensos obtidas pelos alinhamentos (Clustal W) foram analisadas com auxílio do Blastx no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e suas prováveis ORFs (*Open Reading Frame*) identificadas a partir de comparações com genes homólogos de outras espécies. A determinação das sequências das proteínas identificadas para cada uma das espécies de café foi definida com auxílio de um tradutor de sequências do banco Swiss-Prot (<http://ca.expasy.org/sprot/>).

### **3.1.2. Árvore filogenética**

Na construção da árvore filogenética para as aquaporinas de café foram utilizadas as sequências completas das proteínas isoladas do banco EST-Genoma Café, sendo 5 sequências de *C. arabica*, 5 de *C. canephora* e 4 de *C. racemosa*. Foram incluídas na árvore, as 35 MIPs de *Arabidopsis thaliana* (AtMIPs), 24 proteínas de *Zea mays* (ZmMIPs), 21 de *Oryza sativa* (OsMIPs), 14 de *Vitis vinifera*, 7 de *Nicotiana tabacum*, 6 de *Solanum tuberosum*, 3 de *Solanum lycopersicum*, uma de *Antirrhinum majus* e uma aquagliceroporina de *Escherichia coli* (grupo externo), obtidas junto aos bancos Swiss-Prot e GenBank.

Com o objetivo de verificar a similaridade das proteínas entre as 3 espécies de café e, também em relação a outras espécies de plantas, além de propor uma classificação mais adequada para as AQPs encontradas em café, foi feita uma reconstrução filogenética usando o programa MEGA v. 4.0. Adotou-se o método Neighbor-Joining (distância-p) com 1000 repetições nos testes de “bootstrap”. A nomenclatura adotada para as AQPs de café contempladas neste estudo baseou-se na uniformização de nomenclatura proposta para as AtMIPs por Johanson *et al.* (2001).

## **3.2. Estudos com células em suspensão**

### **3.2.1. Indução de calos e estabelecimento da suspensão celular de café**

Plantas matrizes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho (IAC81) provenientes de casa de vegetação foram previamente pulverizadas (3 - 5 dias anteriores à coleta) com o fungicida Benlate® 500 (1,0 g/L de água). Folhas do 1º ou 2º par do ápice dos ramos foram utilizadas para o preparo dos explantes. Após lavagem em água corrente, as folhas foram desinfetadas em solução de Benlate® 500 (1,0 g/L) por 15-20 minutos sob agitação e, posteriormente, em solução de NaClO 1,2 % contendo 2 gotas de Tween 20, por 15 minutos. Em fluxo laminar, sob condições assépticas, o material foi lavado por três vezes em água destilada e autoclavada e cortado em formato de “pente” com cerca de 1,0 cm<sup>2</sup>, visando aumentar a área de contato do tecido foliar com o meio de cultura.

O meio de cultura CIM foi preparado utilizando sais do meio MS e suplementado por 10 mg/L tiamina-HCl, 100 mg/L inositol, 30 g/L sacarose, 4 mg/L cinetina e 1 mg/L 2,4-D com pH 5,8 (Neuenschwander & Baumann, 1992). Adicionou-se ao meio ágar Fitagel Sigma® (2,5 g/L) e o mesmo foi autoclavado a 121°C, a 1,3 atm, por 20 minutos e distribuído em placas de Petri (50 mL/placa). Nas placas, os explantes foram dispostos com a face abaxial voltada para baixo e mantidos no escuro sob temperatura de 25 ± 2°C.

Os calos que apresentavam coloração esbranquiçada e aspecto friável (8 –10 semanas após a indução) foram transferidos para frascos erlenmeyer contendo cerca de 50 mL de meio CIM líquido. A cultura foi multiplicada através de subcultivos quinzenais, sendo mantida no escuro sob agitação constante de 100 rpm, a 25 ± 2°C.

### **3.2.2. Inóculo, tratamento e coleta das células**

Células crescendo em suspensão foram filtradas sob condições assépticas e cerca de 5,0 g de massa fresca de células foram inoculados em erlenmeyer contendo 50 mL de meio CIM líquido com 15% m/v de PEG 8000 (Sigma®). Essa concentração de PEG correspondeu

a um  $\Psi_w$  de cerca de -1,2 MPa, conforme dado obtido por um osmômetro de pressão de vapor (Wescor, modelo C-58) pelo método higrométrico (Kramer & Boyer, 1995), gentilmente determinado pelo Dr. Rafael Vasconcelos, do Instituto Agronômico de Campinas. Foram feitas 3 repetições biológicas por tempo de tratamento: 8, 24 e 72 horas. Para cada tratamento foram montadas triplicatas de material controle 0% PEG8000. As culturas foram mantidas no escuro, sob agitação constante de 100 rpm, a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Ao término de cada tratamento foi realizada uma filtração a vácuo em papel filtro para coletar o meio de cultura para medição de  $\Psi_w$  (armazenado a  $-30^\circ\text{C}$ ). As células foram submetidas a 3 lavagens consecutivas com água destilada e autoclavada para remoção de meio residual, filtradas, congeladas em  $\text{N}_2$  líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  para serem utilizadas nas análises moleculares e bioquímicas.

### **3.2.3. Análise de expressão gênica**

#### ***Extração de RNA total e tratamento com DNase***

Cerca de 200 mg de células foram utilizados para o isolamento do RNA total empregando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen), conforme a recomendação do fabricante. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e sua qualidade analisada com base na relação da absorvância 260 – 280 nm e eletroforese em gel de agarose 1%. O RNA total de cada amostra (5  $\mu\text{g}$ ) foi tratado com DNase (Turbo DNase Ambion®) a fim de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico.

#### ***Síntese da 1ª fita de cDNA e RT-PCR semi-quantitativa***

Para a síntese da 1ª fita de cDNA foi utilizado o kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), usando oligo d(T)<sub>15</sub> como iniciador (“primer”).

Cerca de 5 µg de RNA total foi usado nas reações de síntese de cDNA, a 42°C por 120 min.

Os “primers” específicos foram desenhados com base nas sequências consensos dos genes identificados utilizando o programa de bioinformática GeneRunner. As sequências dos “primers” específicos para os genes Dhs e AQPs estão listadas na tabela 1. A actina de café foi usada como gene normalizador para as RT-PCRs e as sequências de seus “primers” (tabela 1) foram gentilmente cedidas pela Dra. Miriam Peres Maluf, do Instituto Agronômico de Campinas.

Tabela 1: Primers gene-específicos usados nas reações de RT-PCR.

Oligo	Sequência 5'3'	Oligo	Sequência 5'3'
Dh1_forward	GCACTACTGGAGCCTATGG	PIP2;1_reverse	GTTGTAGATGACGGCAGC
Dh1_reverse	GACACGAACGAGATTGAGAT	PIP2;2_forward	GTTCTCAGCCAAGGACTACC
Dh3_forward	GGCAAGAAAGAGGAAGTGA	PIP2;2_reverse	GGCTGCGAAGACTGTGTAG
Dh3_reverse	CTTCAGTCTTGGGATGGTAG	TIP1;1_forward	CTTTGTCTTCGCAGGTGAG
PIP1;1_forward	CGGTGACTTTTGGACTGTT	TIP1;1_reverse	CTGTGGCATAGACGGTGTA
PIP1;1_reverse	CAAGATGATGATGACTCGAAAG	Actina_forward	GACCTCACAGATCACCTCAT
PIP2;1_forward	CGCATCAACACAGAGCACT	Actina_reverse	GTAGTCTCGTGGATACCAGC

Para a normalização da actina foram usadas as seguintes condições de reação: 94°C – 45 s, 56°C – 30 s e 72°C – 60 s. Os genes Dhs (*CaDh1* e *CaDh3*) e AQPs (*PIP1;1* e *PIP2;2*) foram amplificados nas mesmas condições que o gene da actina, enquanto os genes *PIP1;2* e *TIP1;1* foram amplificados a 94°C – 45 s, 57°C – 30 s e 72°C – 60 s. Todas as PCRs foram feitas com o kit Taq DNA Polimerase (Fermentas) com 30 ciclos de amplificação. Os produtos das reações de RT-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e a visualização foi feita no equipamento GEL DOC (Quantity One/BioRad). O mesmo programa foi empregado para medir as densidades dos produtos de PCR (bandas) em gel.

### **3.2.4. Determinações bioquímicas**

Cerca de 250 mg de células de café previamente filtradas e maceradas foram utilizados para a extração com 3 mL de etanol 80%, a 40°C (banho) por 40 min, em tubo de vidro com tampa rosqueada. Após rápida centrifugação, coletou-se a fase líquida e o procedimento foi repetido (re-extração). Homogeneizadas as duas fases coletadas, o extrato foi centrifugado (14000 g, por 15 min à temperatura ambiente) e o sobrenadante foi coletado e estocado em freezer a -30°C. Este extrato foi utilizado como amostra para todas as determinações bioquímicas realizadas no estudo com suspensão celular de café.

#### ***Análises espectrofotométricas: açúcares solúveis totais e sacarose***

A análise de açúcares totais seguiu o método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e a dosagem de sacarose baseou-se no método descrito por Handel (1968). Para ambas as análises, as concentrações nas amostras foram calculadas em função de uma curva padrão de sacarose (0,01 a 0,10 µg/µL).

#### ***Análises espectrofotométricas: aminoácidos livres totais e prolina***

A determinação dos aminoácidos totais foi realizada de acordo com Cocking & Yemm (1954). A concentração nas amostras foi calculada em função de uma curva padrão de leucina (20 a 100 nmoles/mL). O teor de prolina livre foi determinado segundo Bates *et al.* (1973). A concentração nas amostras foi calculada em função de uma curva padrão de prolina (0,6 – 6,0 nmoles/mL).

#### ***Separação de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (HPLC)***

A separação e análise da composição de aminoácidos livres foram realizadas por

cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna de fase reversa, após derivatização com orto-ftaldeído (OPA), conforme Jarret *et al.* (1986).

A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com 2 solventes: “A” - acetato de sódio 50 mM, fosfato de sódio bibásico 50 mM, tetrahidrofurano 2% e metanol 2%, com pH 7,25; “B” - metanol 65%. Ambos foram degaseificados a vácuo.

Utilizou-se uma coluna (LC-18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, SUPELCO) com fluxo de 0,8 mL/min com gradiente de: 25-50% de “B” entre 0 e 35 min, 50-75% de “B” entre 35 e 48 min, 75-97% de “B” entre 48 e 52 min, 97-100% de “B” entre 52 e 57 min, 100% de “B” entre 57 e 65 min e 25% de “B” entre 66 e 70 min. O detector de fluorescência (RF-10AXL, Shimadzu) foi ajustado com  $\lambda$  de excitação de 250 nm e  $\lambda$  de emissão de 480 nm.

A concentração dos aminoácidos foi determinada pela área dos picos integrados, comparados aos picos de um padrão Sigma AAS-18 (15 aminoácidos protéicos) ao qual foram adicionados os aminoácidos asparagina (Asn), glutamina (Gln) e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Gaba), todos à concentração de 250 nmol/mL.

### **3.3. Estudos com plantas de café**

#### **3.3.1. Material vegetal e tratamento de estresse hídrico**

Este estudo incluiu duas espécies de café: *Coffea arabica* L., cultivares Catuaí Vermelho IAC81 e Mundo Novo IAC464 e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, cultivar Apoatã IAC3600-8. Adicionalmente, uma enxertia da cv. Mundo Novo sobre a cv. Apoatã também foi estudada.

As sementes foram obtidas junto ao Instituto Agrônomo de Campinas, com a Dra. Maria Bernadete Silvarolla, com exceção da cv. Mundo Novo, cujas sementes foram provenientes de uma planta matriz cultivada em área externa à casa de vegetação do Instituto

de Biologia da Unicamp. As sementes foram germinadas em recipientes contendo areia e mantidas até atingirem o estágio denominado “palito de fósforo”. Nessa fase, plântulas de Mundo Novo e Aipoatã foram selecionadas para a enxertia, empregando o método hipocotiledonar (Moraes & Franco, 1973). Os enxertos foram mantidos em vasos com areia em câmara úmida por três semanas. Após a seleção das mudas com melhor pegamento, 20 delas foram transplantadas para vasos de 3,8 L (citrovasos) contendo uma mistura de solo e areia (1:1, v/v). Paralelamente, 20 plântulas de Catuaí Vermelho, 20 de Mundo Novo e 20 de Aipoatã foram transplantadas para vasos nas mesmas condições.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação (Instituto de Biologia – UNICAMP) no período de março – abril/2008, com plantas de cerca de 10 meses.

### **3.3.2. Experimento I: Caracterização da murcha foliar e determinação do potencial hídrico**

Para estabelecer um valor de  $\Psi_w$  que permitisse homogeneizar as plantas em um estado de estresse hídrico aproximado, foi conduzido um experimento preliminar no qual a irrigação foi interrompida por completo, buscando-se determinar visualmente o ponto de murcha das folhas, aferindo-se este aspecto com a medição do  $\Psi_w$ . O experimento foi constituído de 3 plantas/cultivar/tratamento (seca ou controle irrigado).

O ponto de estresse hídrico desejado foi definido como aquele no qual as plantas sob estresse hídrico exibissem, por volta das 12 h do dia, sintomas visíveis de murcha nos primeiros pares de folhas e, que às 6 h da manhã subsequente (‘predawn’) não demonstrassem plena recuperação de turgor. Neste estado de murcha, as plantas tiveram seu  $\Psi_w$  ( $\Psi_{pd}$ ) determinado utilizando-se uma bomba de Scholander (Corvallis, Oregon, USA) em folhas completamente expandidas do 2º ou 3º nós do eixo caulinar principal. O  $\Psi_w$  nessas plantas

variou ao redor de -2,0 MPa e o tempo de duração para que atingissem esse nível variou entre 10 – 12 dias após a última rega. A temperatura média variou de  $19,1 \pm 2^\circ\text{C}$  (mínimas) e  $34,1 \pm 2^\circ\text{C}$  (máximas) e a umidade relativa média foi de  $73 \pm 2\%$ .

Deste modo, nos experimentos posteriores, o estado hídrico das plantas foi monitorado pelo aspecto visual de murcha das folhas mais novas às 12h e se, às 6 h da manhã subsequente, os sintomas de murcha fossem mantidos, as plantas eram coletadas e as medições realizadas. Com esta estratégia, as plantas não necessariamente atingiam este ponto no mesmo dia, mas quando o atingiam, o  $\Psi_w$  medido estava ao redor de -2,0 MPa.

### **3.3.3. Experimento II: Tolerância à seca em *Coffea***

Foi constituído de 4 plantas/cultivar/tratamento (seca ou controle irrigado). O tratamento de seca foi imposto por suspensão completa da irrigação até que as plantas apresentassem o sintoma de murcha descrito no item acima. As plantas do tratamento controle foram mantidas sob regime normal de irrigação. As coletas eram realizadas na medida em que as plantas apresentavam o sintoma de murcha, de forma que as coletas ocorreram entre o 9º e o 11º dia após a última rega. Durante o período do experimento a temperatura média variou de  $19,1 \pm 2^\circ\text{C}$  (mínimas) e  $34,1 \pm 2^\circ\text{C}$  (máximas) e a umidade relativa média foi de  $73 \pm 2\%$ .

#### ***Determinações biométricas***

Attingido o ponto de murcha em torno de -2,0 MPa, as plantas foram coletadas e os parâmetros biométricos mensurados. Foram tomadas medidas da altura da parte aérea, comprimento da raiz e massa seca. Duas folhas do 2º ou 3º nó do ápice do eixo principal do caule e as raízes secundárias foram coletadas e mantidas em  $\text{N}_2$  líquido (análises bioquímicas e moleculares). Para a determinação da massa seca os tecidos foram mantidos a  $70^\circ\text{C}$  por 72 h

(folhas, caule e raiz principal). Para as análises bioquímicas, o material vegetal (folhas e raízes) foi liofilizado (-40°C por 96 h); para as análises moleculares, o material foi mantido a -80°C.

### ***Relações hídricas***

As medidas de  $\Psi_w$  foram determinadas em folhas completamente expandidas do 2º ou 3º nós do eixo caulinar principal. Foram tomadas de forma pontual (quando a planta exibia sintomas de estresse em torno de -2,0 MPa) no intervalo das 10 às 12 h com auxílio de uma bomba de Scholander.

### ***Determinações bioquímicas***

Cerca de 200 mg de material liofilizado e macerado (folhas e raízes) foram utilizados para a extração com 3 mL de etanol 80%, a 40°C (banho) por 40 min, em tubo de vidro com tampa rosqueada. Após rápida centrifugação, coletou-se a fase líquida e o procedimento foi repetido (re-extração). Homogeneizadas as duas fases coletadas, o extrato foi centrifugado (14000 g, por 15 min à temperatura ambiente) e o sobrenadante foi coletado e estocado em freezer a -30°C. Posteriormente, o extrato foi seco em speed-vac e o pellet solubilizado em 2,0 mL de água milli-Q. Este extrato foi utilizado como amostra para todas as determinações bioquímicas realizadas no estudo com plantas jovens de café.

As análises espectrofotométricas para açúcares solúveis totais, sacarose, aminoácidos livres totais e prolina, assim como a análise qualitativa de aminoácidos em HPLC para os extratos de folhas e raízes de café, foram realizadas utilizando os mesmos métodos já descritos para as determinações bioquímicas em suspensão celular de café.

### **3.3.4. Experimento III: Caracterização do sistema radicular**

A superfície relativa do sistema radicular dos cafeeiros foi medida segundo o método titulométrico (Ramos & Lima, 1980), com solução de KOH 0,3 N. Foram utilizadas 5 plantas bem irrigadas por genótipo analisado (cv. Apatã IAC3600-8 não foi medida).

### **3.3.5. Estatística**

A análise dos dados bioquímicos obtidos no experimento com suspensão celular de café foi estimada com base na média de 3 repetições/amostra (3 amostras/tratamento) e respectivos desvios padrões (DP).

O delineamento experimental nos experimentos com plantas de café foi realizado inteiramente ao acaso em esquema fatorial. No experimento I, a análise dos resultados foi feita com base nos desvios padrões (DP). Nos experimentos II e III, foram feitas análises de variâncias e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Logo:

Experimento I: resultou em 8 combinações de tratamentos, formando um fatorial de 4x2 (4 genótipos e 2 regimes hídricos) com 3 plantas/tratamento/genótipo;

Experimento II: resultou em 8 combinações de tratamentos, formando um fatorial de 4x2 (4 genótipos e 2 regimes hídricos) com 4 plantas/tratamento/genótipo;

Experimento III: resultou em 6 combinações de tratamentos, formando um fatorial de 3x2 (3 genótipos e 2 regimes hídricos) com 5 plantas/tratamento/genótipo.

A análise estatística realizada para os resultados obtidos pelas determinações bioquímicas do experimento II foi baseada em 3 plantas/tratamento/genótipo. Cada material (folhas e raízes) foi analisado em triplicata, com exceção das análises feitas em HPLC.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Análise e identificação *in silico* de genes relacionados ao estresse hídrico em *Coffea***

A busca por sequências (ESTs) no Banco EST-Genoma Café objetivou a identificação de grupos de genes responsivos ao estresse hídrico, já descritos e caracterizados pela literatura em plantas cultivadas ou não, porém praticamente desconhecidos em café.

Dessa forma, foram selecionadas duas famílias gênicas, sendo uma delas relacionada com uma provável função protetora contra a dessecação celular – as deidrininas – e outra cuja atividade está associada ao transporte de água através das biomembranas – as aquaporinas. Assim, a partir da análise do padrão de expressão desses genes buscou-se avaliar sua correlação com possíveis mecanismos de tolerância à seca em café.

#### **4.1.1. Deidrininas**

As deidrininas (Dhs) são parte de grande grupo de proteínas hidrofílicas conhecidas como LEA e foram originalmente identificadas como família D-11 (Bray, 1993).

As Dhs acumulam-se tipicamente em tecidos da planta que sofrem desidratação, tal como durante o processo de maturação de sementes, e também em tecidos vegetativos submetidos a estresses ambientais como seca, baixas temperaturas e salinidade (Close, 1997). Contudo, estudos mais recentes revelaram que as Dhs também estão presentes em todos os tecidos vegetativos sob condições normais de crescimento (Nylander *et al.*, 2001; Rorat *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005). A ampla distribuição das Dhs em vários tecidos durante o crescimento da planta e a resposta a estresses associados à dessecação celular sugerem que essas proteínas desempenhem uma função essencial no desenvolvimento das plantas e na tolerância a estresses (Rorat, 2006).

Os genes Dhs identificados neste estudo foram similares aos genes previamente descritos em frutos de *C. canephora* por Hinniger *et al.* (2006). A tabela 2 mostra os dados relativos à caracterização das Dhs nas 3 espécies de café incluídas nesse estudo.

Tabela 2: Resultado da busca por sequências de deidrininas no banco EST-Genoma Café.

<b>Deidrininas de Café</b>				
Espécies	Total reads	Gene	Nº reads/gene	Tam. ORF (pb)
<i>C. arabica</i>	45	"CaDh1a" e "CaDh1b"	11 e 5	516
		"CaDh3a" e "CaDh3b"	11 e 14	681 e 675
<i>C. canephora</i>	81	<b>CcDh1a, CcDh1b</b> e "CcDh1c"	10, 4 e 13	516, 525 e 516
		<b>CcDh2a</b>	21	486
		<b>CcDh3</b>	5	681
<i>C. racemosa</i>	11	"CrDh1a"	8	516

Em negrito os genes cujas sequências foram anteriormente descritas por Hinniger *et al.* (2006).

Em concordância com o trabalho de Hinniger *et al.* (2006), nesse estudo também foram identificados os genes “Dh1”, “Dh2” e “Dh3” em *C. canephora*. Naquele estudo, haviam sido caracterizados dois aparentes alelos para o gene CcDh1 – Dh1a e Dh1b – que diferiam entre si por algumas poucas alterações de bases na região codificadora e nas regiões 5’ e 3’ UTR (*UnTranslated Region*). Uma terceira forma variante ou polimórfica do gene “Dh1”, nomeado CcDh1c, foi identificado por nosso estudo, assim como as duas formas alélicas CcDh1a e CcDh1b encontradas anteriormente por Hinniger *et al.* (2006). A presença desses aparentes alelos do gene “Dh1” foi verificada em diversas bibliotecas de cDNA de *C. canephora* (sementes em diferentes estágios de desenvolvimento, pericarpo, folhas sob estresse hídrico ou não). Os alelos CcDh1a e CcDh1b foram idênticos aos encontrados por Hinniger *et al.* (2006), codificam proteínas de 172 e 175 aminoácidos com massas moleculares estimadas em 17,8 e 18,1 kDa, respectivamente. A sequência de CcDh1c identificada por este

estudo é altamente similar à sequência do alelo CcDh1a, sendo formada por 516 pb e diferindo deste por duas mutações pontuais na região codificadora do gene (288<sup>a</sup> e 452<sup>a</sup> bases) e outras nas regiões não codificadoras (5' e 3' UTR), sugerindo tratar-se de um provável polimorfismo do gene “Dh1”. A proteína teórica codificada por CcDh1c possui o mesmo tamanho (172 aminoácidos) e a mesma massa molecular (17,8 kDa) descritos para a proteína do gene CcDh1a, entretanto, a presença de uma mutação do tipo substituição (transversão T-A) no 151<sup>o</sup> códon em CcDh1c alterou o aminoácido valina (Val) para glutamato (Glu).

Hinniger *et al.* (2006) também caracterizaram o gene “Dh2”, com três prováveis alelos, CcDh2, CcDh2a e CcDh2b. O alelo CcDh2a também foi identificado por nosso estudo, codificando uma proteína de 162 aminoácidos de massa molecular aproximadamente igual a 17,4 kDa. Ainda no trabalho de Hinniger *et al.* (2006), foi descrito o gene CcDh3 identificado sob a forma de sequência única (apenas um alelo), o qual também foi encontrado em nosso estudo, codificando uma proteína de 227 aminoácidos e massa igual a 25,0 kDa. A análise de sequências similares ao gene “Dh3” em *C. canephora* apontou algumas possíveis mutações em relação à proteína originalmente descrita e codificada pelo gene CcDh3, o que poderia sugerir a presença de uma forma variante do gene nessa espécie. No entanto, não foi possível caracterizar por completo a região codificadora dessa suposta forma polimórfica, permanecendo assim a confirmação de apenas uma forma alélica para o gene “Dh3”.

Conforme indicado na tabela 2, nosso estudo identificou em *C. arabica* sequências homólogas aos genes CcDh1 e CcDh3 (Hinniger *et al.*, 2006), ambos com duas prováveis formas variantes em café arábica. Em relação ao gene “Dh1”, foram identificadas as variantes CaDh1a e CaDh1b, ambas com o mesmo tamanho (516 pb) que o alelo CcDh1a identificado em frutos de *C. canephora*. CaDh1a possui duas bases modificadas (324<sup>a</sup> e 452<sup>a</sup> bases) em comparação ao homólogo CcDh1a, que resultam em duas mutações que alteram o aminoácido na proteína codificada em café arábica. Já a variante CaDh1b possui 10 bases alteradas (6<sup>a</sup>,

93<sup>a</sup>, 160<sup>a</sup>, 216<sup>a</sup>, 219<sup>a</sup>, 288<sup>a</sup>, 395<sup>a</sup>, 424<sup>a</sup>, 452<sup>a</sup> e 511<sup>a</sup> bases) em relação ao gene *CcDh1a*, as quais resultam em cinco aminoácidos mutados na proteína codificada por este gene. Ambos *CaDh1a* e *CaDh1b* codificam proteínas constituídas por 172 aminoácidos e com massa molecular estimada de 17,8 kDa.

Para o gene “Dh3” também foram encontrados duas possíveis variantes polimórficas em café arábica: *CaDh3a* (681 pb) e *CaDh3b* (675 pb). Suas sequências diferem em 16 alterações de base na região codificadora dos genes (91<sup>a</sup>, 98<sup>a</sup>, 179<sup>a</sup>, 339<sup>a</sup>, 374<sup>a</sup>, 401<sup>a</sup>, 513<sup>a</sup>, 523<sup>a</sup>, 525<sup>a</sup>, 528<sup>a</sup>, 535<sup>a</sup>, 591<sup>a</sup>, 609<sup>a</sup>, 624<sup>a</sup>, 639<sup>a</sup> e 662<sup>a</sup> bases), além de uma aparente inserção de 6 nucleotídeos entre as posições 646<sup>a</sup> e 651<sup>a</sup> no alelo *CaDh3a*. As respectivas proteínas codificadas em *C. arabica* são formadas por 227 aminoácidos e massa estimada de 25,1 kDa, em *CaDh3a*, e 225 aminoácidos e massa aproximada de 24,9 kDa, em *CaDh3b*. Em café arábica não foram identificados homólogos ao gene “Dh2”.

Na espécie *C. racemosa* foi encontrado apenas uma sequência homóloga ao gene “Dh1” (Hinniger *et al.*, 2006), denominada “*CrDh1a*”, que codifica uma proteína de mesmo tamanho (227 aminoácidos) e massa molecular (25,0 kDa) que seu provável ortólogo em *C. canephora* (*CcDh1*). Difere deste por 9 bases (6<sup>a</sup>, 75<sup>a</sup>, 219<sup>a</sup>, 246<sup>a</sup>, 257<sup>a</sup>, 288<sup>a</sup>, 424<sup>a</sup>, 432<sup>a</sup> e 452<sup>a</sup> bases) o que, por sua vez, resulta em uma proteína com três aminoácidos modificados (86<sup>o</sup>, 142<sup>o</sup> e 151<sup>o</sup>) em relação à proteína do gene *CcDh1a*.

A identificação de apenas um gene em *C. racemosa* certamente pode estar associada ao reduzido número de reads sequenciados e validados para essa espécie, para a qual foram construídas apenas duas bibliotecas de frutos (FR4 e FV2), que juntas somaram cerca de 15.000 sequências (Vieira *et al.*, 2006).

Os alinhamentos das deidrininas de café com proteínas homólogas obtidas junto ao banco de sequências de proteínas não-redundantes do GenBank através do NCBI e a análise de “motifs” deidrina específicos Y, S e K (Close, 1996) estão indicados nas figs. 1 e 2.

```

1 MAQYGNQDQM--R-RITDEYGNHVOET-----GVYQGTGTGMMGGT--G AAC49618 tomato
1 MAHYENQYSAGQALQKDEYGNPVRQT-DEYGNP-----IQQTGGTMGEYGT--G CAA75798 batata
1 MASYNRPGGQ-AT--DEYGNPQQQYDEYGNPMGGGGYGTGGGGGATGGQYGG NP201441 A. thaliana
1 MAQYGAEYGNQ-KSQYDEYGNPVRQT-DEYGNP-----ARH-GGTMGDYGT--G ABC55670.1 CcDh1a
1 MAQYGAEYGNQ-KSQYDEYGNPVRQT-DEYGNP-----ARH-GGTMGDYGT--G ABC55671.1 CcDh1b
1 MAQYGAEYGNQ-KSQYDEYGNPVRQT-DEYGNP-----ARH-GGTMGDYGT--G "CaDh1a"
1 MAQYGAEYGNQ-KSQYDEYGNPVRQT-DEYGNP-----ARH-GGTMGDYGT--G "CaDh1b"
1 MAQYGAEYGNQ-KSQYDEYGNPVRQT-DEYGNP-----ARH-GGTMGDYGT--G "CaDh1c"
1 MAQYGAEYGNQ-KSQYDEYGNPVRQT-DEYGNP-----ARH-GGTMGDYGT--G "CrDh1a"
1 MADIRDEYGNP-MQITDOYGNP-V-CLKDEYGNP-----MQL-SGVAITAGTA--- ABC55672.1 CcDh2a

40 TGGMMGGTGG--EYGT--QMGGTGT-----HHHEGQQQLRR----- AAC49618 tomato
48 -----YGT--QAGHTTGVLG-G-----DQ-----RQH--GTL CAA75798 batata
52 TGGQGYSGSQ-G-YGTG-GQGYGTGTGTGEGFTGGGARHHGQEQQLHKESGGGL NP201441 A. thaliana
46 TTGAYGGTTG---AHGT-YATGTTGTTGTG-----AYATQPGTDVGKEH--HGL ABC55670.1 CcDh1a
46 TTGAYGGTTGTAGAHGT-YATGTTGTTGTG-----AYATQPGTDVGKER--HGL ABC55671.1 CcDh1b
46 TTGAYGGTTG---AHGT-YATGTTGTTGTG-----AYATQPGTDVGKEH--HGL "CaDh1a"
46 TTGAYGGTAG---AHGT-YATGTTGTTGTG-----AYATQPGTDVGKEH--HGL "CaDh1b"
46 TTGAYGGTTG---AHGT-YATGTTGTTGTG-----AYATQPGTDVGKEH--HGL "CaDh1c"
46 TTGAYGGTTG---AHGT-YATGTTGTTGTG-----AYATQPGTDVGKEH--RGL "CrDh1a"
45 --SAVH-STGT---GP---TAATGT-----QQHQEQ----- ABC55672.1 CcDh2a

72 -----SDSSSSSEDDGEGG-RRKKGLKEKIMEKMPGD-HEG----- AAC49618 tomato
72 GGMLHRSGSSSSSSSEDDGHGGRKKKGIKDKVKEKLPGG-HRDDLAH----- CAA75798 batata
103 GGMLHR-SGSGSSSSS-DDGQGG-RRKKGITQKIKEKLPGH-HDQSGQA----- NP201441 A. thaliana
89 GGMLHR-SGSGSSSSSEDDGQGG-RRKKGMKEKIKEKLPGG-HKEAQP----- ABC55670.1 CcDh1a
92 GGMLHR-SGSGSSSSSEDDGQGG-RRKKGMKEKIKEKLPGG-HKEAQP----- ABC55671.1 CcDh1b
89 GGMLHR-SGSGSSSSSEDDGHGG-RRKKGMKEKIKEKLPGG-HKEAQP----- "CaDh1a"
89 GGMLHR-SGSGSSSSSEDDGQGG-RRKKGMKEKIKEKLPGG-HKEARPG----- "CaDh1b"
89 GGMLHR-SGSGSSSSSEDDGQGG-RRKKGMKEKIKEKLPGG-HKEAQP----- "CaDh1c"
89 GGMLHR-SGSGSSSSSEDDGQGG-RRKKGMKEKIKEKLPGG-HKEAQP----- "CrDh1a"
67 ---LHR-SSSSSSGSEDDGQGGRRKGGKGLKEKIKEKLTGGRHKDRDDQEHIDD ABC55672.1 CcDh2a

106 -----EYQTTGE-----EKKGMDKIKDKIPGMH* AAC49618 tomato
120 ----S-TATTTTTGYGMDGT-----HEKKGIMEKIKEKLPGHGPGHH* CAA75798 batata
148 QAMGGMGSGYDAGGYGGEH-----HEKKGMDKIKEKLPGGGR* NP201441 A. thaliana
135 QEY---SSATAAPGYGGEVQ----HEKKGIMDKIKEKLPGGHNN* ABC55670.1 CcDh1a
138 QEY---SSATAAPGYGGEQ----HEKKGIMDKIKEKLPGGHNN* ABC55671.1 CcDh1b
135 QEY---SSATAAPGYGGEQ----HEKKGIMDKIKEKLPGGHNN* "CaDh1a"
135 QEY---SSATTAPGYGGEQ----HEKKGIMDKIKEKLPGGHNN* "CaDh1b"
135 QEY---SSATAAPGYGGEQ----HEKKGIMDKIKEKLPGGHNN* "CaDh1c"
135 QEY---SSATTAPGYGGEQ----HEKKGIMDKIKEKLPGGHNN* "CrDh1a"
117 QHAHSASPPTTTTGSTSTTVGGQQHEKKSMEKIMEKLPGHHDTR* ABC55672.1 CcDh2a

```

Figura 1: Alinhamento das deidrin de café obtido pelo Clustal W (programa BioEdit) e otimizado manualmente. Os aminoácidos conservados entre as sequências estão indicados em cinza. As regiões destacadas identificam o “motif”  $Y_3SK_2$  que caracteriza essas proteínas: os retângulos duplos indicam os segmentos Y (3), o retângulo simples indica o segmento S (1) e os tracejados indicam os segmentos K (2). Números de acesso: *Solanum lycopersicum* dehydrin TAS14, AAC49618; *Solanum commersonii* dehydrin Dh1, CAA75798; *Arabidopsis thaliana* dehydrin RAB18, NP\_201441; *Coffea canephora* dehydrin DH1a, ABC55670; *Coffea canephora* dehydrin DH1b, ABC55671; *Coffea canephora* dehydrin DH2a, ABC55672.

1	MADQYEKK-----VEEGS-ANVEATDRGLDFLGGKKEEKPTHAQEEHAISSEFV	BAD13499 tabaco
1	MADQYEQNK-----PSVEETVGANVEATDRGLDFLGGKKEEKPSHAHEEEAISSEFC	AAP44575 batata
1	MAEYKNNVKEHETPTVATEESPATTEVTDRGLDFLGGKKEEV--KPQETTITLSEFD	CAA62449 <i>A. thaliana</i>
1	MA-EYDQSN-----IKVEEGS--AVEATDRGLFN-LGKKEEVK--KCDQGQAISAEFD	ABC68275 CcDh3
1	MA-EYDQSN-----IKVEEGS--AVEATDRGLFN-LGKKEEVK--KCDQGQAISAEFD	"CaDh3a"
1	MA-EYDQSN-----IKVEEGS--AVEATDRGLFN-LGKKVVEEK--KCDQGQAISAEFD	"CaDh3b"
50	EKVKVSEEVA-----EYKEEEKKEEHNKEEKLHRS-----SSSSSSSSSDEE	BAD13499 tabaco
54	EKVKVSEE-----EEHKEKEKKEE-----KKLHRS-----SSSSSSSSSDEE	AAP44575 batata
59	HKAQISEPELAAEHEEVKENKITLLEELQEKTEEDENKPSVIEKLHRSN-----SSSSSSSDEE	CAA62449 <i>A. thaliana</i>
48	EKVRVSEP-----DKEEGKK--HGGLLEKLHRS-----SSSSSSSSSEEE	ABC68275 CcDh3
48	EKVRVSEP-----DKEEGKK--HGGLLEKLHRS-----SSSSSSSSSEEE	"CaDh3a"
48	EKVRVSEP-----DKEEEKK--HGGLLEKLHRS-----SSSSSSSSSEEE	"CaDh3b"
92	EEIGEDGQK---IKKKKKKGLKDKIKDKISQ---EHKEEEKAG---EDTAVPVKEYEET--	BAD13499 tabaco
89	EEIGEDGQI---IKKKKKKGLKEKIKKISQ---DHKEEVKT---EDTSVPVKEYEET--	AAP44575 batata
119	GEEKKEKKKIVEGEEHDKKGLVEKIKKELPCHHDKTAEDDVP---VSTTIPVPVSESVVE	CAA62449 <i>A. thaliana</i>
85	VEEGGE--KK---KKKKEKKGLKDKIKKISQ---DKKDEEKVEKCEEDTSIPVEKYAEPAH	ABC68275 CcDh3
85	VEEGGE--KK---KKKKEKKGLKDKIKKISQ---DKKDEEKVEKCEEGTSIPVEKYAEPAH	"CaDh3a"
85	VEEGGE--KK---KKKKEKKGLKDKIKKISQ---DKKDEEKVEKCEEDTSIPVEKYDEPAH	"CaDh3b"
142	-----FEKKGFLDKIKEKLPGGQKKTEEVAP---PPP-----P---AAEHEAEG-KE	BAD13499 tabaco
138	-----FEKKGFLEKIKEKLPGGHKKTEEVAA---PPP-----PPPAVDHEAEG-KE	AAP44575 batata
176	HDHPE--FEKKGLVEKIKEKLPGHHDEKAEDSPAVTSTPLVVTETHPVEPTTELPVEHPPEE	CAA62449 <i>A. thaliana</i>
139	ADAAHEPFEKKGFLDKIKEKLPGGQKKTEEVAAAAPP-----PPAECTATEGEA-KD	ABC68275 CcDh3
139	ADAAHEPFEKKGFLDKIKEKLPGGQKKTEEVAAAAPP-----PPAECTATEGEA-KD	"CaDh3a"
139	ADAAHEPFEKKGFLDKIKEKLPGGQKKTEEVAAAAPP-----PSAECTATEGEA-KD	"CaDh3b"
183	KKGFLDKIKEKLPGYHSTK-EEKKKK-	BAD13499 tabaco
182	KKGFLDKIKEKLPGYHSTK-EEEKEKEKD*	AAP44575 batata
234	KKGILEKIKEKLPGYHAKTTEEEVKKEKESDD*	CAA62449 <i>A. thaliana</i>
192	KKGFLDKIKEKLPGYHPKT-EEEEKEKEKEKEAGCH*	ABC68275 CcDh3
192	KKGFLDKIKEKLPGYHPKT-EEEEKEKEKEKEAGCH*	"CaDh3a"
192	KKGFLDKIKEKLPGYHPKT-EEEEKEKEKGE--AGCH*	"CaDh3b"

Figura 2: Alinhamento de deidrinas de café obtido pelo Clustal W (programa BioEdit) e otimizado manualmente. Os aminoácidos conservados entre as sequências estão indicados em cinza. As regiões destacadas identificam o “motif” SK<sub>3</sub> que caracteriza essas proteínas: o retângulo simples indica o segmento S (1) e os tracejados indicam os segmentos K (3). Números de acesso: *Nicotiana tabacum* dehydrin parcial, BAD13499; *Solanum soganandinum* 25 kDa protein dehydrin, AAP44575; *Arabidopsis thaliana* dehydrin, CAA62449; *Coffea canephora* dehydrin DH3, ABC68275.

Com base no número e na ordem dos domínios conservados têm sido determinadas distintas subclasses de Dhs (Close, 1997). De acordo com o alinhamento, as deidrinas de café agruparam-se em duas diferentes subclasses, com as proteínas “Dh1” e “Dh2” possuindo uma estrutura do tipo Y<sub>3</sub>SK<sub>2</sub> (fig. 1), enquanto as proteínas “Dh3” caracterizam-se pela presença da estrutura SK<sub>3</sub> (fig. 2).

Todas as Dhs são tipicamente caracterizadas por um domínio conservado de 15 aminoácidos rico em lisina, EKKGIMDKIKEKLP, denominado segmento K, o qual usualmente está localizado na porção C-terminal (Close, 1996). O número de segmentos K varia de 1 a 11 cópias por peptídeo (Close, 1997), e diversas evidências demonstram que os segmentos K formam  $\alpha$ -hélices anfipáticas capazes de interagir com as membranas celulares e com proteínas parcialmente desnaturadas (Rorat *et al.*, 2004).

Outras regiões menos conservadas, porém não menos importantes para a funcionalidade dessas proteínas, também podem ser identificadas: segmento S (rico em resíduos de serina), um “motif” consenso T/VDEYGNP localizado próximo ao N-terminal, denominado segmento Y, além de certas regiões mais variáveis ricas em aminoácidos polares (segmentos  $\Phi$ ) (Close, 1996).

Uma análise dos “motifs” deidrina específicos mostra que eles são altamente conservados entre as três espécies de café estudadas (100% de identidade), exibindo diferenças pontuais em relação à proteína do gene “Dh2”. Em “Dh1” (fig. 1), os segmentos K e Y identificados em café apresentam algumas variações em relação aos seus respectivos consensos. Para os segmentos K de “Dh1” foi identificado, além do consenso padrão, uma segunda sequência consenso – RKKGMKEKIKEKLP – divergente em apenas 4 resíduos de aminoácidos. Nos segmentos Y foram verificadas as variantes T/YDEYGNP e GAHEYGNQ. O mesmo fato também foi verificado para o segmento K das proteínas “Dh3”, sendo o consenso em café representado pela sequência E/DKKGL/FK/LDKIKEKI/LS/PG. Tal variação identificada nas Dhs de café não é rara, tendo sido reportada por Close (1997).

A análise global das deidrinhas “Dh1” e “Dh3” evidencia uma alta conservação entre as três espécies de café, com identidade superior a 95%. Em *C. canephora*, o provável alelo CcDh1c encontrado por nosso estudo apresentou 99,6% de identidade com o gene CcDh1a descrito por Hinniger *et al.* (2006). Uma comparação entre as “Dh1” de café com as demais

proteínas do alinhamento (fig. 1) indicou uma identidade média de 40% com tomate, 53% com batata e 49% com *A. thaliana*, enquanto “Dh3” apresentou cerca de 58% de identidade com tabaco e batata e 40% com *A. thaliana* (fig. 2).

#### **4.1.2. Aquaporinas**

A família das aquaporinas (AQPs) consiste de proteínas hidrofóbicas que promovem o transporte passivo de água através de biomembranas (Maurel, 1997; Maurel & Chrispeels, 2001). Pertencem a uma ampla e evolutivamente conservada superfamília das proteínas MIPs e são encontradas em todos os organismos, desde bactérias e fungos até animais e vegetais. Nas plantas, as AQPs ocorrem em múltiplas isoformas, de tal modo que no genoma de *A. thaliana* foram identificados 35 homólogos destas proteínas e uma diversidade similar é prevista para outras espécies de plantas (Chaumont *et al.*, 2001; Johanson *et al.*, 2001).

A diversificação das AQPs em plantas em contraste com cerca de 10 AQPs identificadas em mamíferos, inclui múltipla localização sub-celular e expressão diferencial ao longo do desenvolvimento da planta e sob condição de estresse, sugerindo um importante papel dessas proteínas para balanço hídrico nas plantas (Johansson *et al.*, 2000; Maurel *et al.*, 2002).

Com efeito, a indução ou inibição no nível dos transcritos de mRNA codificando homólogos de proteínas MIP sob condição de estresse hídrico foi descrita em várias espécies de plantas. Yamaguchi-Shinozaki *et al.* (1992) reportaram aumento na expressão do gene PIP2;3 de *A. thaliana* (rd28), o que também foi verificado para os genes PIP1;3, PIP1;4, PIP2;1 e PIP2;5 de *A. thaliana* em estudo realizado por Jang *et al.* (2004). Resultados similares foram obtidos para genes PIPs (NeMIP1, NeMIP2 e NeMIP3) de *Nicotiana excelsior* (Yamada *et al.*, 1997), CpPIPa6 e CpPIPa2 em plantas ressureição *Craterostigma plantagineum* (Mariaux *et al.*, 1998). A expressão dos genes TIPs também foi elevada em

arroz (Liu *et al.*, 1994), girassol (Sarda *et al.*, 1997) e couve-flor (Barrieu *et al.*, 1999) em plantas sob estresse hídrico. A repressão de genes PIPs e TIPs também foi observada em plantas submetidas a déficit hídrico (Mariaux *et al.*, 1998; Sarda *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Smart *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2004; Mahdieh *et al.*, 2008).

Embora a correlação entre as múltiplas isoformas das AQPs e suas funções integradas em condições de estresse não estejam completamente estabelecidas (Jang *et al.*, 2007), diversos trabalhos têm evidenciado importantes alterações no padrão de expressão desses genes sob tais condições, indicando que esses genes são regulados pelo status de água nas plantas, e que, portanto, poderiam estar envolvidos em mecanismos de tolerância à seca em plantas (Maurel, 1997; Jang *et al.*, 2007).

No presente estudo, foram analisadas sequências de cDNA de possíveis homólogos de AQPs obtidas do banco EST-Genoma Café, sendo identificados quatro genes em café arábica, com seus prováveis ortólogos nos cafês robusta e racemosa (tabela 3).

Tabela 3: Resultado da busca por sequências de aquaporinas no banco EST-Genoma Café.

Aquaporinas de Café				
Espécies	Total reads	Gene	Nº reads/gene	Tam. ORF (pb)
<i>C. arabica</i>	438	"CaPIP1;1"	46	858
		"CaPIP2;1"	13	846
		"CaPIP2;2"	19	864
		"CaTIP1a" e "CaTIP1b"	107 e 18	771 e 771
<i>C. canephora</i>	192	"CcPIP1;1"	30	858
		"CcPIP1;2"	2	852
		"CcPIP2;1"	80	846
		"CcPIP2;2"	4	846
		"CcTIP1;1"	39	771
<i>C. racemosa</i>	63	"CrPIP1;1"	11	858
		"CrPIP2;1"	10	846
		"CrTIP1;1"	20	771
		"CrTIP1;2"	3	753

Análises de similaridade na sequência primária das proteínas de café comparativamente a sequências de AQPs em outras espécies de plantas (Blastp), aliado a informações posicionais de cada uma delas em uma árvore filogenética construída para o grupo (ver fig. 6 desse mesmo item) foi observado que os respectivos genes de café que codificam para tais proteínas agruparam-se nas subfamílias PIP ou TIP, sendo nomeadas segundo a uniformização de nomenclatura para as MIPs de *A. thaliana* (AtMIPs) proposta por Johanson *et al.* (2001).

Dentro da subfamília “PIP”, foram identificados em *C. arabica* um gene da subclasse 1 denominado CaPIP1, codificando uma proteína de 286 aminoácidos e massa molecular estimada em 30,8 kDa e dois membros da subclasse 2, CaPIP2;1 e CaPIP2;2, que codificam proteínas de 282 e 288 aminoácidos com massas moleculares aproximadas de 30,3 kDa e 30,8 kDa, respectivamente. Para *C. canephora*, foram definidos dois genes pertencentes à subclasse 1, CcPIP1;1 e CcPIP1;2, e dois genes da subclasse 2, CcPIP2;1 e CcPIP2;2, que respectivamente, codificam proteínas de 286, 284, 282 e 288 aminoácidos com correspondentes massas moleculares preditas de 30,8 kDa, 30,5 kDa, 30,2 kDa e 30,8 kDa. Em *C. racemosa* foi encontrado um gene em cada uma das subclasses 1 e 2, CrPIP1;1 e CrPIP2;1, codificando proteínas de 286 e 282 aminoácidos e massas moleculares de 30,8 kDa e 30,2 kDa.

Na subfamília “TIP”, os genes identificados nas três espécies de café foram pertencentes à subclasse 1. Foi determinado em *C. arabica* um gene nomeado CaTIP1;1 com duas aparentes formas variantes “a” e “b” que diferem entre si por 8 bases (posições 328, 462, 477, 600, 661, 666, 735 e 747), com ambas as proteínas possuindo 257 aminoácidos e massas moleculares aproximadas de 26,5 kDa. Em *C. canephora* foi caracterizado um membro pertencente a essa subfamília, CcTIP1;1, codificando uma proteína de 257 aminoácidos e massa molecular aproximada de 26,5 kDa. Para *C. racemosa* foram caracterizados dois genes,

CrTIP1;1 e CrTIP1;2, cujas expressões resultam em proteínas de 257 e 251 aminoácidos e massas aproximadas de 26,6 kDa e 25,9 kDa, respectivamente.

As figs. 3, 4 e 5 representam os alinhamentos das AQPs de café com proteínas homólogas de outras espécies de plantas obtidas junto ao banco de sequências de proteínas não-redundantes no NCBI.

A análise global dos alinhamentos indica alta conservação na sequência primária da proteína entre as espécies de café, nas quais a identidade entre os prováveis ortólogos variou de 71 - 96% (figs. 3, 4 e 5). Foram identificados os dois “motifs” NPA (Asn-Pro-Ala) conservados que constituem os 2 “loops” envolvidos na formação do poro de água: o citosólico, “loop B”, entre o segundo e o terceiro domínios transmembrana e o extra-citosólico, “loop E”, entre o quinto e o sexto domínios transmembrana (Chaumont *et al.*, 2005).

O alinhamento das regiões N- e C-terminal das proteínas, localizadas na face citoplasmática da membrana, tenderam a apresentar um maior grau de variação, além da presença de certos “gaps” (PIP2 e TIP1) entre os membros de uma mesma subfamília. Tal constatação já havia sido reportada para as AtMIPs por Johanson *et al.* (2001).

A comparação entre as AQPs de café e proteínas homólogas em outras espécies de plantas também indicou um alto grau de similaridade (figs. 3, 4 e 5). Para a subfamília PIP, verificou-se que as proteínas PIP1 de café apresentaram identidade de cerca de 86% com tomate e *A. thaliana* e de 83% com arroz e milho, enquanto em PIP2 a identidade variou de 72 - 87% em relação à batata e *A. thaliana* e de 74 - 80% com milho. Em TIP1, a comparação entre as proteínas de café e demais sequências alinhadas apontou um menor grau de conservação em torno de 53% com tabaco, 67% com *A. thaliana*, 66% com milho e 65% com arroz.

1	MAENKEEDVVLGANKFRETQPLGTAQT-D-KDYKEPPPAPLFEPGELSSWSFYRAGI	Q08451.1 tomato
1	M-EGKEEDVRLGANRYTERQPIGTAAQGAEEKDYREPPAAPVFEVEELTWSFYRAGI	Q9SXF8.2 arroz
1	M-EGKEEDVRLGANRYSERQPIGTAAQGTTEEKDYKEPPPAPLFEAEELTWSFYRAGI	Q9AR14.1 milho
1	M-EGKEEDVNVGANKFPERQPIGTAAQT-ESKDYKEPPPAPFFEPGELKSSWSFYRAGI	NP194071.1 <i>A. thaliana</i>
1	MAEGKEEDVVLGANKFTERQPLGTAQT-D-KDYKEPPPAPLFEPGELSSWSFYRAGI	"CaPIP1"
1	M-ENKEEDVRLGANKFSERQPIGTAAQTQD-KDYQEPAAAALFDPDELASWSFYRAGI	"CcPIP1;1"
1	MAEGKEEDVVLGANKFTERQPLGTAQT-D-KDYKEPPPAPLFEPGELSSWSFYRAGI	"CcPIP1;2"
1	MAEGKEEDVVLGANKFTERQPLGTAQT-D-KDYKEPPPAPLFEPGELSSWSFYRAGI	"CrPIP1"
57	AEFMATFLFLYITILTVMGLKRSD-SLCSVGIQGVAVAFGGMIFALVYCTAGISGGH	Q08451.1 tomato
58	AEFVATFLFLYISILTVMGVNKA-SKCATVGIQGIAWSFGGMIFALVYCTAGISGGH	Q9SXF8.2 arroz
58	AEFVATFLFLYISILTVMGVSKSS-SKCATVGIQGIAWSFGGMIFALVYCTAGISGGH	Q9AR14.1 milho
57	AEFIATFLFLYVTVLTMGVKR-APNMCASVGIQGIAWAFGGMIFALVYCTAGISGGH	NP194071.1 <i>A. thaliana</i>
57	AEFMATLLFLYITILTIMGVNRSTPNKASVGIQGIAWAFGGMIFALVYCTAGISGGH	"CaPIP1"
57	AEFIATFLFLYISIMTMGVSKSD-SKCVTVGIQGIAWAFGGMIFALVYCTAGISGGH	"CcPIP1;1"
57	AEFMATLLFLYITILTIMGVNRSTPNKASVGIQGIAWAFGGMIFALVYCTAGISGGH	"CcPIP1;2"
57	AEFMATLLFLYITILTIMGVNRSTPNKASVGIQGIAWAFGGMIFALVYCTAGISGGH	"CrPIP1"
113	INPAVTFGLFLARKLSLTRAVFYVMQCLGAI CGAGVVKGFVMPYQRLGGGANVNP	Q08451.1 tomato
114	INPAVTFGLFLARKLSLTRAVFYAMQCLGAI CGAGVVKGFQRGLYMGSGGGANVNP	Q9SXF8.2 arroz
114	INPAVTFGLFLARKLSLTRALFYVMQCLGAI CGAGVVKGFQEGLYMGAGGGANVNP	Q9AR14.1 milho
113	INPAVTFGLFLARKLSLTRALFYIVMQCLGAI CGAGVVKGFQPGLYQTNGGGANVVAH	NP194071.1 <i>A. thaliana</i>
114	INPAVTFGLFLARKLSLTRAVFYIVMQCLGAI CGAGIVKGFQKGPYERSKGGVNYVQH	"CaPIP1"
113	INPAVTFGLFLARKLSLTRAFFYVMQCLGAI CGAGVVKGFQKHLVQSKGGGANVNGH	"CcPIP1;1"
114	INPAVTFGLFLARKLSLTRAVFYIVMQCLGAI CGAGIVKGFQKGPYERSKGGVNYVQH	"CcPIP1;2"
114	INPAVTFGLFLARKLSLTRALFYIVMQCLGAI CGAGIVKGFQKGPYERSKGGVNYVQH	"CrPIP1"
171	GYTKGDGLGAEIIGTFVLVYTVFSATDAKRNARD SHVPI LAPLP IGFVFLVHLATIP	Q08451.1 tomato
172	GYTKGDGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAKRNARD SHVPI LAPLP IGFVFLVHLATIP	Q9SXF8.2 arroz
172	GYTKGDGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAKRSARD SHVPI LAPLP IGFVFLVHLATIP	Q9AR14.1 milho
171	GYTKGSGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAKRSARD SHVPI LAPLP IGFVFLVHLATIP	NP194071.1 <i>A. thaliana</i>
172	GYTKGDGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAKRNARD SHVPI LAPLP IGFVFLVHLATIP	"CaPIP1"
171	GYTKGDGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAKRSARD SHVPI LAPLP IGFVFLVHLATIP	"CcPIP1;1"
172	GYTKGDGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAKRNARD SHVPI LAPLP IGFVFLVHLATIP	"CcPIP1;2"
172	GYTKGDGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAKRNARD SHVPI LAPLP IGFVFLVHLATIP	"CrPIP1"
237	ITGTGINPARSLGAAI IYNDEHAWNDHWIFVWGPFIGAALAAIYHQIIRAMPFHRS*	Q08451.1 tomato
238	ITGTGINPARSLGAAI VYNRAHAWNDHWIFVWGPFIGAALAAIYHVVIIRAIPFKSRD*	Q9SXF8.2 arroz
238	ITGTGINPARSLGAAI VYNRSHAWNDHWIFVWGPFIGAALAAIYHVVIIRALPFKSRD*	Q9AR14.1 milho
237	ITGTGINPARSLGAAI IYNKDHAWDDHWIFVWGPFIGAALAAIYHQIVIRAIPFKSKT*	NP194071.1 <i>A. thaliana</i>
238	ITGTSINPARSLGAAI IYNRDLGWDDHWIFVWGPFIGAALAAVYHQIVIRAIPFKSRA*	"CaPIP1"
237	ITGTGINPARSLGAAI IYNQKPAWDDHWIFVWGPFIGAALAAIYHQVVIRAIPFKSK*	"CcPIP1;1"
238	ITGTSINPARSLGAAI IYNRDLGWDDHWIFVWGPFIGAALAAVYHQIVIRAIPFKSRA*	"CcPIP1;2"
238	ITGTSINPARSLGAAI IYNRDLGWDDHWIFVWGPFIGAALAAVYHQIVIRAIPFKSRA*	"CrPIP1"

Figura 3. Alinhamento de aquaporinas (subfamília PIP, subclasse 1) de café obtido pelo Clustal W (programa BioEdit) e otimizado manualmente. Os aminoácidos conservados estão indicados em cinza. Os retângulos identificam os dois “motifs”NPA (Asn-Pro-Ala) característicos das aquaporinas. Números de acesso: *Solanum lycopersicum* probable aquaporin PIP-type, Q08451; *Oryza sativa* OsPIP1;3, Q9SXF8; *Zea mays* ZmPIP1;5, Q9AR14; *Arabidopsis thaliana* AtPIP1;5, NP\_194071.

1	MSKDVIE---EGQVHHRGKDYVDPAPLLDMAELTKWSFYRAVIAEFIATLLFLYVTVA	ABC01884.1 batata
1	MAKDVEQVT--EQGEYSAKDYHDPAPLIDPDELTKWSLYRAAIAEFIATLLFLYITVL	Q9ATM4.1 milho
1	MAKDVEG-P-EG---FQTRDYEDPPP TPFDDADELTKWSLYRAVIAEFVATLLFLYITVL	NP181254.1 <i>A.thaliana</i>
1	MSKEVSE---EG--RH-GKDYVDPAPLLDMAELKLSFYRAIIAEFIATLLFLYVTVA	NP179277.1 <i>A.thaliana</i>
1	MSKEVGE---EGQTQHR-KDYVDPAPLLDFAECLKWSFYRALIAEFIATLLFLYVTIA	"CaPIP2;1"
1	MAKDVEGVVAEQGEFSAKDYHDPAPAFFDLDELTKWSFHRALIAEFVATLLFLYVTVL	"CaPIP2;2"
1	MSKEVSE---EGQTQH-GKDYVDPAPLLDFAECLKWSFYRALIAEFVATLLFLYVTIA	"CcPIP2;1"
1	MAKDVEGVVAEQGEFSAKDYHDPAPAFFDLDELTKWSFHRALIAEFVATLLFLYVTVL	"CcPIP2;2"
1	MSKEVSE---EGQTQHG-KDYVDPAPLLDFGELKLSFYRALIAEFIATLLFLYVTIA	"CrPIP2"
58	TVIGHKKN-----KLDQCDGVGILGIAWAFGGMIFVLVYCTAGISGGHINPAVTFGLFL	ABC01884.1 batata
59	TIIGYKRQSDTKIPNTECDGVGILGIAWAFGGMIFILVYCTAGISGGHINPAVTFGLFL	Q9ATM4.1 milho
55	TVIGYKIQSDTKAGGVD-CGGVILGIAWAFGGMIFILVYCTAGISGGHINPAVTFGLFL	NP181254.1 <i>A.thaliana</i>
55	TVIGHKNQ-----TGPCGGVLLGIAWAFGGMIFVLVYCTAGISGGHINPAVTFGLFL	NP179277.1 <i>A.thaliana</i>
57	TVIGHKVRY-----AADQCDGVGILGIAWAFGGMIFILVYCTAGISGGHINPAVTFGLFL	"CaPIP2;1"
61	TVIGYKHQTDTTAGG-DDCNGVILGIAWAFGGMIFILVYCTAGISGGHINPAVTFGLFL	"CaPIP2;2"
57	TVIGHKVRY-----AADQCDGVGILGIAWAFGGMIFILVYCTAGISGGHINPAVTFGLFL	"CcPIP2;1"
61	TVIGYKHQTDATAGG-DDCNGVILGIAWAFGGMIFILVYCTAGISGGHINPAVTFGLFL	"CcPIP2;2"
57	TVIGHKVRY-----AADQCDGVGILGIAWAFGGMIFVLVYCTAGISGGHINPAVTFGLFL	"CrPIP2"
112	ARKVSLIRAVAYIIAQSLGAICGVGFVKLFMKHYNAEGGGANFVQPGYNKGTALGAEII	ABC01884.1 batata
118	GRKVSILVRALLYMIAQCAGAI CGAGLAKGFQKSFYNRYGGGVNTVSDGYNKGTALGAEII	Q9ATM4.1 milho
113	ARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVGFVKAFQSSYYDRYGGGANSLADGYNTGTGLAAEII	NP181254.1 <i>A.thaliana</i>
107	ARKVSLPRAVAYMVAQCLGAICGVGLVKAFMMPYKRLGGGANVADGYSTGTALGAEII	NP179277.1 <i>A.thaliana</i>
111	ARKVSLFRAVAYMVAQCLGAICGVGLVKAFMKHHYNTWGGGANVMHGYSKGTALGAEII	"CaPIP2;1"
119	ARKVSLRAFFYMVAQCLGAICGVGLVKAFQKSFYNRYGGGANVAHGTYIGVGLAAEII	"CaPIP2;2"
111	ARKVSLFRAVAYMVAQCLGAICGVGLVKAFMKHHYNTWGGGANVTHGYSKGTALGAEII	"CcPIP2;1"
119	ARKVSLRAFFYMVAQCLGAICGVGLVKAFQKSFYNRYGGGANVVAHGTYIGVGLAAEII	"CcPIP2;2"
111	ARKVSLFRAVAYMVAQCLGAISGVGLVKGMKHHYNTWGGGANVMHGYSKGTALGAEII	"CrPIP2"
171	GTFVLVYTVFSATDPKRSARDSHVPVLAPLPIGFVAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAA	ABC01884.1 batata
177	GTFVLVYTVFSATDPKRNARDSHVPVLAPLPIGFVAVFMVHLATIPVTGTGINPARSFGPA	Q9ATM4.1 milho
172	GTFVLVYTVFSATDPKRNARDSHVPVLAPLPIGFVAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAA	NP181254.1 <i>A.thaliana</i>
166	GTFVLVYTVFSATDPKRSARDSHVPVLAPLPIGFVAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAA	NP179277.1 <i>A.thaliana</i>
170	GTFVLVYTVFAATDPKRSARDSHVPVLAPLPIGFVAVFMVHLGTIPITGTGINPARSFGAA	"CaPIP2;1"
178	GTFVLVYTVFAATDPKRNARDSHIPVLAPLPIGFVAVFMVHLGTIPVTGTGINPARSFGAA	"CaPIP2;2"
170	GTFVLVYTVFAATDPKRSARDSHVPVLAPLPIGFVAVFMVHLGTIPITGTGINPARSFGAA	"CcPIP2;1"
178	GTFVLVYTVFAATDPKRNARDSHIPVLAPLPIGFVAVFMVHLGTIPVTGTGINPARSFGAA	"CcPIP2;2"
170	GTFVLVYTVFAATDPKRSARDSHVPVLAPLPIGFVAVFMVHLGTIPITGTGINPARSFGAA	"CrPIP2"
230	VIYGNEKIWDDQWIFVWGPVVGAMAAAIYHQFVLRAGAVEAFGSFRSNQTN*	ABC01884.1 batata
236	VIFNNDKAWDDQWIYVWGPVVGAAVAAIYHQYILRGAIKALGSFRSNA*	Q9ATM4.1 milho
231	VIYNKSKPWDDHWIFVWGPVVGAAIAAFYHQFVLRASGSKSLGSFRSAAV*	NP181254.1 <i>A.thaliana</i>
225	VIYNNEKAWDDHWIFVWGPVVGALAAAAYHQYILRAAAIKALASFRSNPTN*	NP179277.1 <i>A.thaliana</i>
229	VIYNNDKAWDDQWIFVWGPVVGALAAAAYHQYILRAAAIKALGSFRSNPTN*	"CaPIP2;1"
237	VIYGSRQAWDDHWIFVWGPVVGAAIAAFYHQYILRAGAIKALGSFRSNA*	"CaPIP2;2"
229	VIYNNDKVWDDQWIFVWGPVVGALAAAAYHQYILRAAAIKALGSFRSNPTN*	"CcPIP2;1"
237	VIYGSRQAWDDHWIFVWGPVVGAAIAAFYHQYILRAGAIKALGSFRSNA*	"CcPIP2;2"
229	VIYNNDKVWDDQWIFVWGPVVGALAAAAYHQYILRAAAIKALGSFRSNPTN*	"CrPIP2"

Figura 4. Alinhamento de aquaporinas (subfamília PIP, subclasse 2) de café obtido pelo Clustal W (programa BioEdit) e otimizado manualmente. Os aminoácidos conservados estão indicados em cinza. Os retângulos identificam os dois “motifs” NPA (Asn-Pro-Ala) característicos das aquaporinas. Números de acesso: *Solanum tuberosum* PIP2-like protein, ABC01884; *Zea mays* ZmPIP2;7, Q9ATM4; *Arabidopsis thaliana* AtPIP2;2, NP\_181254 e AtPIP2;8, NP\_179277.

1	M--V-----RIAFGSIGDSFSVGS LKAYVAEF IATLLFV FVAGVGS AIAYNKLTADAALD	CAA38634.1 tabaco
1	MP-V-S----RIAVGAPGELSHPD TAKAAVAEF ISTLIFV FVAGSGSGMAF SKLTDGGAAT	Q9ATM0.1 milho
1	MP-V-S----RIAVGAPGELSHPD TAKAAVAEF ISMLIFV FVAGSGSGMAF SKLTDGGGTT	Q94CS9.1 arroz
1	MP--IN----RIAIGTPEASRPDA IRAAFAEFF SMVIFV FVAGQSGMAY GKLTGDGPAT	NP_192056.1 <i>A. thaliana</i>
1	MPEVIRV PFRRIAFGNREE IROPGAIK AALAE L I STLIFV FVAGEGSGMAY SKLTGGAPST	"CaTIP1a"
1	MPEVIRV PFRRIAFGNREE IROPGAIK AALAE L I STLIFV FVAGEGSGMAY SKLTGGAPST	"CaTIP1b"
1	MPEVIRV PFRRIAFGNREE IROPGAIK AALAE L I STLIFV FVAGEGSGMAY SKLTGGAPST	"CcTIP1"
1	MP--IS----RIAIGSPA EASQPDAL KAALAE F ISMLIFV FVAGEGSGMAF SKLTDNGSTT	"CrTIP1;2"
1	MPEVVRV PFRRIAFGNREE IROPGAIK AALAE L I STLIFV FVAGEGSGMAY SKLTGGAPSS	"CrTIP1;1"
53	PAGLIVAVAVHAFALFVGV SIAANISGGH LNP AVTLGLAVGGNI IILTGFF YWIAQLLGS	CAA38634.1 tabaco
57	PAGLIAASLAHALALFVAV SVGANISGGH VNP AVTFGAFVGGNI SLLKALVYVWAQLLGS	Q9ATM0.1 milho
57	PSGLIAASLAHALALFVAV SVGANISGGH VNP AVTFGAFVGGNI SLVKAVYVWAQLLGS	Q94CS9.1 arroz
57	PAGLIVAASLSHAFALFVAV SVGANVSGGH VNP AVTFGAF IGGNI TLLRAILY WIAQLLGA	NP_192056.1 <i>A. thaliana</i>
61	PAGLISAALAYGLGLFVGV SVSANISGGH VNP AVTIGAF LGGNI TLF RGLLY IIGQLVGS	"CaTIP1a"
61	PAGLISAALAYGLGLFVGV SVSANISGGH VNP AVTIGAF LGGNI TLF RGLLY IIGQLVGS	"CaTIP1b"
61	PAGLISAALAYGLGLFVGV SVSANISGGH VNP AVTIGAF LGGNI TLF RGLLY IIGQLVGS	"CcTIP1"
57	PAGLIVAAAI AHAFALFVAVSVA ANISGGH VNP AVTFGAFVGGH I TLLRSVLY WIAQLLGA	"CrTIP1;2"
61	PAGLIIAALAYGLGLFVGV SVSANISGGH VNP AVTIGAF LGGNI TLF RGLLY IIGQLVGS	"CrTIP1;1"
112	TVACL L LK VY T NGLAVP THGVAAG I NGLQGVMEI I I T FALVYTVYATAADPKKGS LGTI	CAA38634.1 tabaco
116	VVACL L LK IATGGAALGAF SLSAGV GAMNAV VLEVM T FGLVYTVYATAVDPKKGDLGVI	Q9ATM0.1 milho
116	VVACL L LK IATGGAAVGAF SLSAGV GAWNAV VFEI VMT FGLVYTVYATAVDPKKGDLGVI	Q94CS9.1 arroz
116	VVACL L LK VSTGGMETAAF SLSYG VTPWNAV VFEI VMT FGLVYTVYATAVDPKKGDI GII	NP_192056.1 <i>A. thaliana</i>
120	IIACL L LK VSTGGMKTSALS LAHGVS VWDAF ILEI VMT FGLVYTVYATAIDPKKGDVGTI	"CaTIP1a"
120	IIACL L LK VSTGGMKTSALS LAHGVS VWDAF ILEI VMT FGLVYTVYATAIDPKKGDVGTI	"CaTIP1b"
120	IIACL L LK VSTGGMKTSALS LAHGVS VWDAF ILEI VMT FGLVYTVYATAIDPKKGDVGTI	"CcTIP1"
116	VVACL L LK FSTGGLETA AF SLS SSVS VWDAF ILEI VMT FGLVYTVYATAIDPKKGD LGII	"CrTIP1;2"
120	IIACL L LK VSTGGMKTTALS LVHGVS VWDAF ILEI VMT FGLVYTVYATAIDPKKGDVGTI	"CrTIP1;1"
171	APIAIGF IVGANILAAGPF SGGSMN PARSF GPAVWAGDF SQNWI YWAGPL IGGGLAGFIY	CAA38634.1 tabaco
175	APIAIGF IVGANILAGGAFD GASMNPA VSF GPAVVTGVWENHWYVWGP LAGAAIAALVY	Q9ATM0.1 milho
175	APIAIGF IVGANILAGGAFD GASMNPA VSF GPAVVTGVWENHWYVWLP FVGAIAAALIY	Q94CS9.1 arroz
175	APLAIGL IVGANILVGGAFD GASMNPA VSF GPAVSWIWTNHWYVWGP FVGAIAAIVY	NP_192056.1 <i>A. thaliana</i>
179	APIAIGL IVAANILAGGAFD GASMNPA VSF GPAVSWTWTNHWYVWAGP IVGAVIAAAVY	"CaTIP1a"
179	APIAIGL IVAANILAGGAFD GASMNPA VSF GPAVSWTWTNHWYVWAGP IVGAVIAAAVY	"CaTIP1b"
179	APIAIGL IVAANILAGGAFD GASMNPA VSF GPAVSWTWTNHWYVWAGP IVGAVIAAAVY	"CcTIP1"
175	APIAIGF IVGANILAGGAFD GASMNPA VSF GPAVSWTWTGHVYVWLP FVGAIAAIVY	"CrTIP1;2"
179	APIAIGL IVAANILAGGAFD GAAMNPA VSF GPAVSWTWTNHWYVWAGP IVGAVIAAAVY	"CrTIP1;1"
230	GDVFIGCH--TPLPTS-EDYA*	CAA38634.1 tabaco
234	DIIFIGQRPHQQLPTTAADY*	Q9ATM0.1 milho
234	DIIFIGQRPHDQLP--TADY*	Q94CS9.1 arroz
234	DTIFIGSNGHEPLP--SNDY*	NP_192056.1 <i>A. thaliana</i>
238	EIFFIDHS-HEAVP--AADY*	"CaTIP1a"
238	EIFFMDHS-HEAVP--AADY*	"CaTIP1b"
238	EIFFMDHS-HEAVP--AADY*	"CcTIP1"
234	ELFFVHQT-HEQLP--VAEY*	"CrTIP1;2"
238	EIFFIDHS-HEAVP--AADY*	"CrTIP1;1"

Figura 5: Alinhamento de aquaporinas (subfamília TIP, subclasse 1) de café obtido pelo Clustal W (programa BioEdit) e otimizado manualmente. Os aminoácidos conservados estão indicados em cinza. Os retângulos identificam os dois “motifs” NPA (Asn-Pro-Ala) característicos das aquaporinas. Números de acesso: *Nicotiana tabacum* possible membrane channel protein, X54855; *Zea mays* ZmTIP1;2, Q9ATM0; *Oryza sativa* OsTIP1;2, Q94CS9; *Arabidopsis thaliana* GAMMA-TIP3/TIP1;3, NP\_192056.

A classificação das AQPs identificadas de café foi realizada através da árvore de distância obtida a partir das 35 AtMIPs e demais proteínas homólogas em batata, tomate, tabaco, uva, arroz, milho, além de uma proteína de bactéria como grupo externo (fig. 6). Assim, a partir de 127 sequências de AQPs (incluindo 14 de café) foi construída uma árvore de distância simplificada, preservando as relações de similaridade gerais entre as espécies.

A classificação das MIPs de plantas em 4 subfamílias (PIP, TIP, NIP e SIP), a partir da similaridade na sequência primária das proteínas, foi bem estabelecida por análises filogenéticas realizadas em milho (Chaumont *et al.*, 2001) e em *A. thaliana* (Johanson *et al.*, 2001).

As PIPs constituem a subfamília com maior número de genes em milho (14) e *A. thaliana* (13), caracterizam-se por uma extensa homologia entre suas proteínas e dividem-se em 2 grupos - PIP1 e PIP2. Com base nestas características foi proposto que a expansão das PIPs ocorreu recentemente e de modo independente após a divergência entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (Chaumont *et al.*, 2001; Johanson *et al.*, 2001). Já as TIPs possuem 13 genes em milho e 10 em *A. thaliana* com menor similaridade entre si, dividindo-se em 5 grupos - TIP1, TIP2, TIP3, TIP4 e TIP5 - caracterizados em ambas as espécies (Chaumont *et al.*, 2001; Johanson *et al.*, 2001).

Pela análise da topologia da árvore para AQPs de café, foi possível distinguir dois blocos de sequências temporalmente divergentes referentes às subfamílias PIP e TIP, ambos com valor de “bootstrap” igual a 100%. As sequências de café são altamente similares entre si, principalmente entre os membros da subfamília PIP (fig. 6).

Dentro da subfamília PIP, também tornou-se nítida a subdivisão em dois grupos, conforme definido para as AtMIPs por Johanson *et al.* (2001): PIP1 e PIP2. No clado PIP1 foram reunidas as sequências das proteínas homólogas às AtPIP1, que em café foi representada por um gene em café arábica (CaPIP1;1), dois genes distintos em café robusta

(CcPIP1;1 e CcPIP1;2) e um gene em café racemosa (CrPIP1;1). No clado PIP2 agruparam-se as proteínas homólogas às AtPIP2, incluindo dois genes de café arábica (CaPIP2;1 e CaPIP2;2) e em café robusta (CcPIP2;1 e CcPIP2;2) e um gene em café racemosa (CrPIP2;1), conforme verificado pela árvore filogenética (fig. 6).

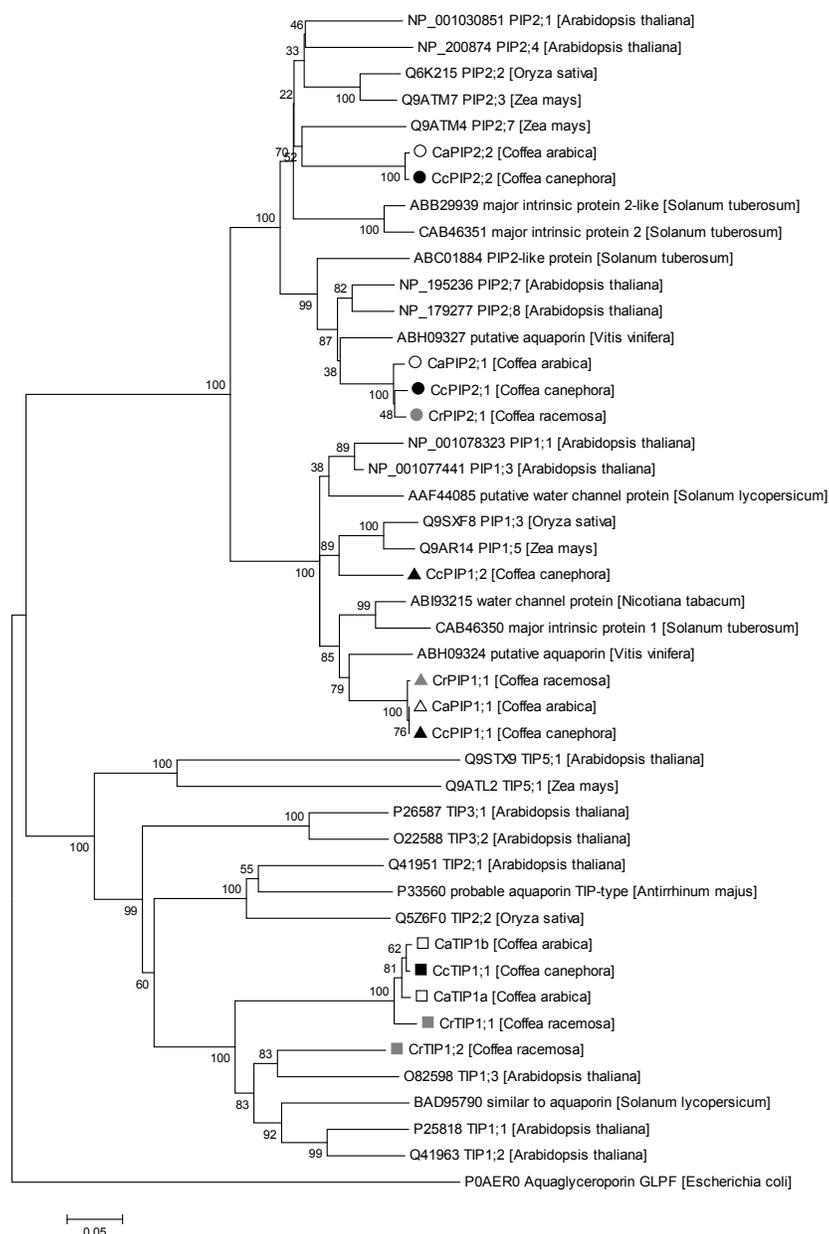


Figura 6: Árvore de distância para as aquaporinas de café. A árvore foi obtida usando-se o alinhamento das proteínas completas pelo método Neighbor-Joining (programa MEGA4). Os testes de “bootstrap” foram realizados com 1000 repetições e todas as posições com “gaps” no alinhamento foram desconsideradas no pareamento das sequências (“pairwise deletion”). Os símbolos indicam: Δ = PIP1, O = PIP2 e □ = TIP1.

Em TIP, as sequências das proteínas de café permaneceram reunidas no grupo de proteínas similares às AtTIP1, representando um gene em café arábica (CaTIP1a/b) e em café robusta (CcTIP1;1) e dois genes em café racemosa (CrTIP1;1 e CrTIP1;2).

## 4.2. Ensaio de estresse hídrico em suspensão celular de café cv. Catuaí Vermelho

### 4.2.1. Determinação do potencial hídrico no meio de cultura

Este ensaio utilizou PEG8000 como indutor de estresse osmótico na concentração de 15% (m/v) em meio de cultura. A definição de tal concentração baseou-se em dados da literatura (Villela & Beckert, 2001; Al-Khayri & Al-Bahrany, 2004; Kobae *et al.*, 2006), considerando-se ainda aspectos relativos ao grau de viscosidade do meio, de modo que o suplemento de PEG não interferisse com a adequada oxigenação no meio de cultura.

Para cada um dos tempos de tratamento (8, 24 e 72 h) foram realizadas medidas de  $\Psi_w$  no meio de cultura para avaliar possíveis variações ao longo do tempo de tratamento. De acordo com a fig. 7, verificou-se que o  $\Psi_w$  tendeu a manter-se constante, com médias de -1,30 MPa no tratamento de estresse (15% PEG) e de -0,90 MPa no controle (0% PEG).

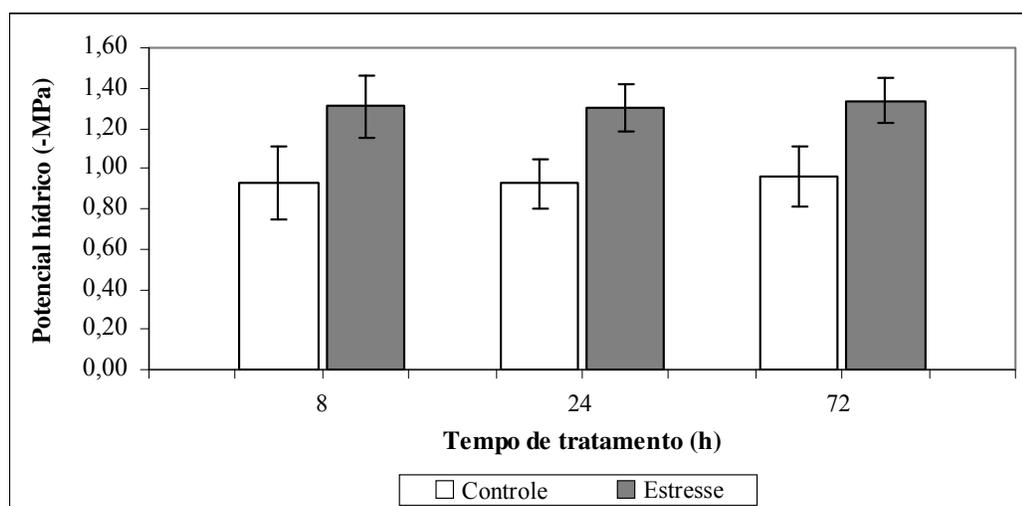


Figura 7: Potencial hídrico do meio de cultura de suspensões celulares de café (*C. arabica*, cv. Catuaí Vermelho) submetidas a estresse osmótico (15% PEG) (n = 3; barra = desvio padrão).

### 4.3. Análises de expressão: Northern eletrônico e RT-PCR semiquantitativa

#### 4.3.1. Deidrinas

A distribuição do número de ESTs de Dhs identificadas dentro de cada biblioteca, considerando sua abundância relativa a 100% das sequências aceitas de todas as bibliotecas resultantes da busca, indica de maneira indireta a expressão do gene em uma dada biblioteca, e foi representada na fig. 8 pelo northern eletrônico (N.E.) das espécies de café estudadas.

Em *C. arabica*, foram identificados genes com alta similaridade com os genes “Dh1” e “Dh3” de *C. canephora* descritos por Hinniger *et al.* (2006), distribuídos em 15 bibliotecas (figs. 8 A e 8 C).

A análise da distribuição de sequências de *C. arabica* similares ao gene “Dh1” entre essas bibliotecas apontou um acúmulo considerável de transcritos em SS1 (pool de tecidos - campo irrigado), enquanto sob condição de déficit hídrico (SH2) a abundância foi extremamente reduzida (fig. 8 A). Além disso, outra biblioteca também relacionada a estresse osmótico (CS1: suspensão celular tratada com manose, NaCl e KCl) não apresentou aumento significativo de transcritos do gene “Dh1” a partir dos dados obtidos pelo N.E. (fig. 8 A). Em relação ao gene “Dh3” (fig. 8 C), observou-se uma tendência de aumento de expressão em bibliotecas de raízes (RT5: raiz com BION – indutor de resistência a doenças) e calo/células em suspensão (CB1, CL2, CS1 e PC1).

Em *C. canephora* as sequências dos genes “Dh1/Dh2” e “Dh3” distribuíram-se entre 6 bibliotecas (figs. 8 B e 8 D), sendo amplamente representadas nas bibliotecas de frutos/sementes (SE1, SE2, SE3 e SE4), ocorrendo com menor frequência nas bibliotecas de folhas submetidas (SH3) ou não (LF1) a estresse hídrico. É importante ressaltar que a exceção da biblioteca SH3, as demais bibliotecas de folhas/frutos de *C. canephora* (LF1, SE1, SE2, SE3 e SE4) são oriundas do projeto Cornell-Nestlé (Lin *et al.*, 2005), a partir das quais foram caracterizados os genes “Dh1”, “Dh2” e “Dh3” (Hinniger *et al.*, 2006).

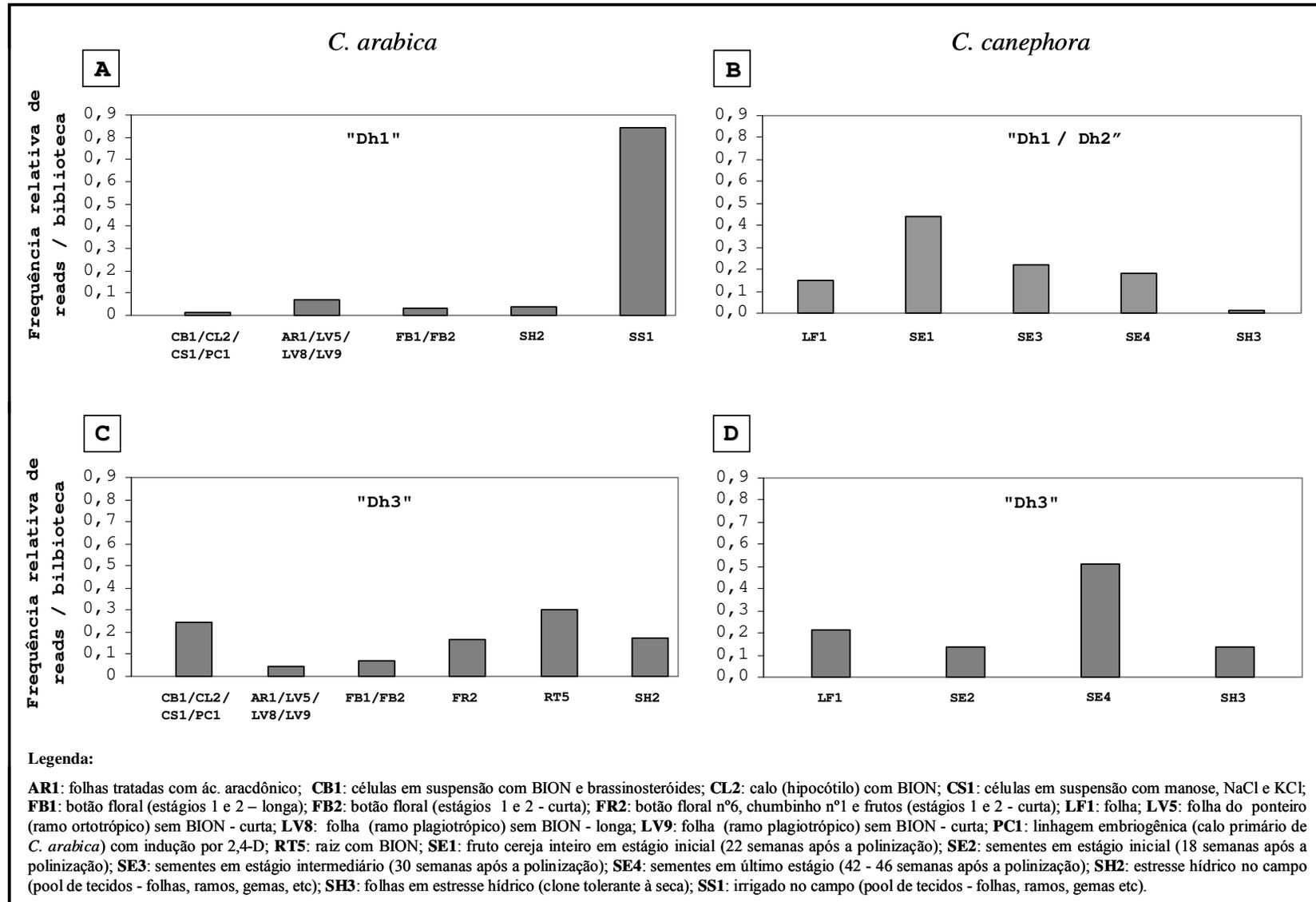


Figura 8. Northern eletrônico das deidrinhas identificadas em *C. arabica* (A e C) e *C. canephora* (B e D). Sequências obtidas junto aos bancos do projeto EST-Genoma Café e do consórcio Cornell-Nestlé.

Nossos estudos confirmaram, assim, as sequências descritas por Hinniger *et al.* (2006) e sugerem uma nova variante para o gene “Dh1” , denominada “CcDh1c”, derivada das sequências obtidas das bibliotecas de frutos/sementes (projeto Cornell-Nestlé) e de folhas sob estresse hídrico (SH3).

A partir de 11 sequências obtidas da biblioteca de fruto de *C. racemosa* (FR4) foi possível identificar apenas um gene que indicou alta homologia com o gene “Dh1” de *C. canephora* (Hinniger *et al.*, 2006).

A ampla distribuição de Dhs em tecidos vegetativos de café sob condições normais de crescimento constitui importante evidência de que essas proteínas não apenas estão relacionadas a situações de estresse, podendo exibir expressão constitutiva e diferencial associada ao tipo de órgão e/ou célula, bem como a distintos estágios de desenvolvimento. Estudos recentes desenvolvidos em *Solanum sp.* mostraram que na ausência de estresse a expressão no nível da proteína de desidrinas do tipo-SK, foi fortemente detectada em órgãos como flor, ramos, tubérculos e folhas jovens (Rorat *et al.*, 2004; Rorat *et al.*, 2006). Ensaios imunohistoquímicos realizados em *A. thaliana* sob condições normais de crescimento (Nylander *et al.*, 2001), indicaram o acúmulo de Dhs em diferentes tipos celulares associados ao tecido vascular de raízes primárias (células internas e adjacentes do tecido vascular) e no caule (células internas e bordas das células parenquimáticas).

Por outro lado, é fato que diversos estudos têm reportado uma correlação positiva entre o acúmulo de transcritos ou proteínas de Dhs e tolerância a estresses tais como frio, seca e salinidade (Xu *et al.*, 1996; Cellier *et al.*, 1998; Tabaei-Aghdaei *et al.*, 2000; Nylander *et al.*, 2001; Allagulova *et al.*, 2003; Khurana *et al.*, 2008). A baixa frequência de transcritos de Dhs observada em bibliotecas de células e/ou tecidos de café induzidas por estresse osmótico, hídrico ou salino em relação a respectivas condições controle pode estar associada a perda de informações relativas ao método de busca (palavra-chave), ainda que esta estratégia tenha

retornado várias das sequências identificadas por Hinniger *et al.* (2006). Por outro lado, fatores relacionados a aspectos intrínsecos relativos ao preparo e à montagem de algumas das bibliotecas produzidas pelo EST-Genoma Café, também poderiam explicar essa falta de correspondência, uma vez que, por exemplo, a biblioteca de suspensão celular de café CS1 foi tratada simultaneamente com manose, NaCl e KCl (Vieira *et al.*, 2006), podendo existir interferência de uma substância/sal sobre o efeito da/o outra. Do mesmo modo, as bibliotecas SH2 (“pool” de tecidos de plantas submetidas à seca) e seu respectivo controle SS1 (“pool” de tecidos de plantas irrigadas) apresentaram enorme discrepância no N.E. (fig. 8 A), sendo o acúmulo de transcritos cerca de 20 vezes maior em SS1 (com apenas cerca de 700 reads totais aceitos) em relação a SH2 (com 5185 reads totais aceitos).

Análises de RT-PCR indicaram que a expressão do gene Dh1 foi aumentada nas suspensões celulares sob estresse osmótico em relação ao controle (figs. 9 e 10 A) e tende a aumentar em função do tempo de tratamento, enquanto permanece relativamente constante nos tratamentos controle. O acúmulo de transcritos do gene “Dh1” já havia sido relatado por Hinniger *et al.* (2006) durante os últimos estágios de desenvolvimento de frutos dos cafés robusta e arábica, além de uma expressão mais discreta em diversos outros tecidos como ramos, folha jovem e flor.

Nesse mesmo experimento, o gene CaDh3 aparentemente não exibiu resposta diferencial aos tratamentos aplicados, uma vez que a densidade de suas bandas durante o estresse manteve-se similar às do controle (figs. 9 e 10 B), indicando que, talvez, esse gene não seja responsivo ao estresse osmótico. Hinniger *et al.* (2006) observaram expressão do gene Dh3 em diversos tecidos do grão em café arábica e nos três últimos estágios de desenvolvimento do grão em robusta, além de outros tecidos como pericarpo, ramos e flores, em ambas as espécies.

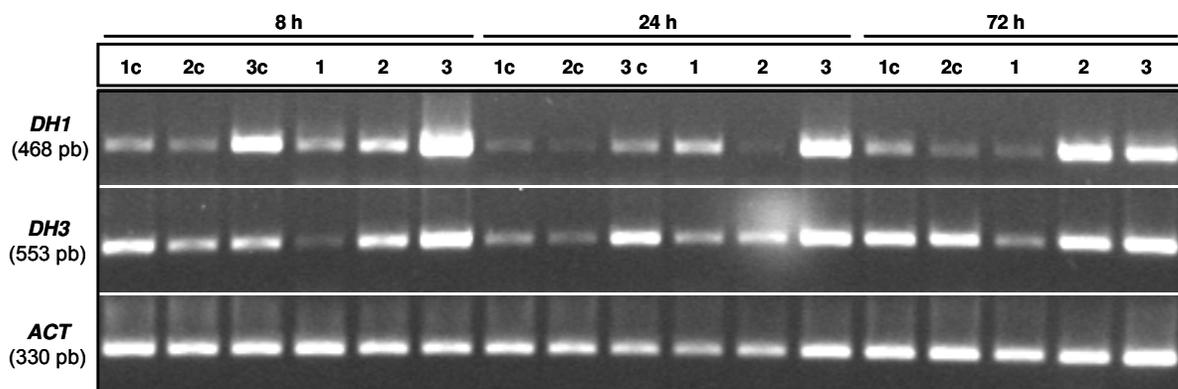


Figura 9. RT-PCR semi-quantitativa para dois genes deidrinas (Dh1 e Dh3) em suspensão celular de *C. arabica*. Para cada tempo de tratamento (8, 24 ou 72 h) estão indicadas as amostras controle 0% PEG (identificadas por um número seguido da letra c) e as amostras sob estresse osmótico 15% PEG (identificadas apenas por um número). ACT indica o gene normalizador da PCR. Os tratamentos estão em triplicatas (exceção para o tratamento controle às 72 h).

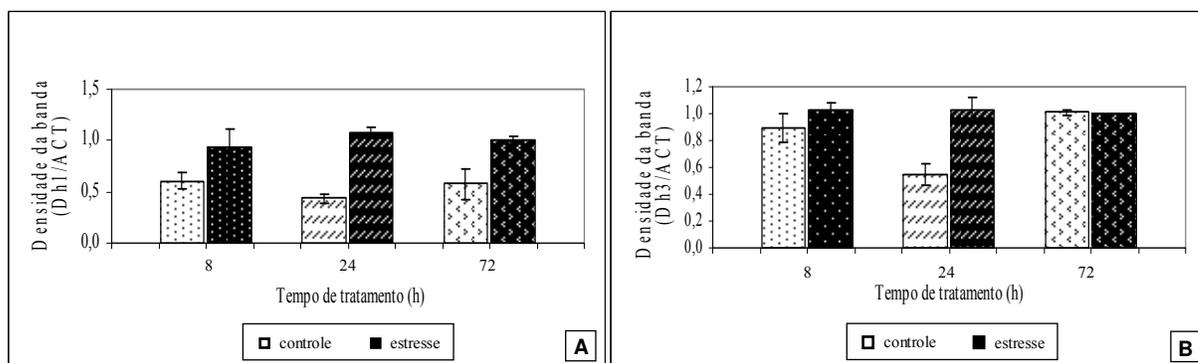


Figura 10. Normalização da expressão dos genes CaDh1 e CaDh3 em função do gene ACT (actina) de expressão constitutiva em suspensão de células de *C. arabica* (n = 3; barra = desvio padrão).

Análises histoquímicas de plantas transgênicas de tabaco para o gene *tas14* de tomate, que codifica uma deidrina acumulada em resposta a manitol, NaCl e ABA, exibiram intensa atividade de GUS localizada, principalmente, no tecido vascular, região mais externa do córtex e meristema apical de raízes adventícias, sendo também detectada nas células-guarda e nos tricomas (Parra *et al.*, 1996). Em *A. thaliana*, o padrão de expressão do gene RAB18 caracterizado por northern blot mostrou acúmulo de transcritos preferencialmente em raízes e caule induzidos por ABA e estresse salino, enquanto análises de imunolocalização indicaram acúmulo da proteína no tecido vascular de diversos órgãos (raiz, caule, folha e flor) ou tipos

celulares (mesófilo e células-guarda) em plantas tratadas com ABA (Nylander *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos para os genes TAS14 e RAB18, sugerem uma provável função protetora das Dhs durante o estresse osmótico causado pelo déficit hídrico, salinidade ou baixas temperaturas (Nylander *et al.*, 2001). Assim, o envolvimento das Dhs na regulação do potencial osmótico da célula poderia explicar a localização tecido e/ou tipo celular específico dessas proteínas em plantas não estressadas (por exemplo, a presença de RAB18 no núcleo das células-guarda, onde o alto potencial osmótico do citoplasma durante a abertura estomática poderia promover o acúmulo da proteína no núcleo) (Nylander *et al.*, 2001).

A homologia observada entre a proteína “Dh1” de café e as proteínas TAS14 de tomate e RAB18 de *A. thaliana* (40% e 49% de identidade, respectivamente) aliado aos resultados obtidos para a suspensão celular de café tratada com PEG, reforçam a proposta de uma função protetora contra os efeitos nocivos do estresse osmótico, atuando na estabilização e integridade da maquinaria de transcrição sob condições desfavoráveis (Egerton-Warburton *et al.*, 1997).

De acordo com Allagulova *et al.* (2003), as proteínas com estrutura do tipo SK<sub>n</sub> como é o caso de Dh3 de café, são preferencialmente induzidas por baixas temperaturas, segundo indicam os resultados obtidos para a proteína WCOR410, cuja presença é significativamente maior no trigo de inverno que no da primavera em plantas submetidas a 4°C (Danyluk *et al.*, 1998), bem como para um homólogo em cevada (DHN8) que é ativamente expresso durante tratamentos de frio (Choi *et al.*, 1999). Dados reportados por Rorat *et al.* (2006) para a proteína DHN24 de *Solanum*, classificada como deidrina do tipo SK<sub>3</sub>, identificou expressiva diferença na abundância dessa proteína entre plantas com alta ou baixa habilidade de aclimação ao frio, demonstrando que o aumento no acúmulo de DHN24 ocorreu apenas em plantas com alta habilidade de aclimação.

Tendo em vista a similaridade entre as proteínas Dh3 de café e DHN24 de batata

devido à proximidade taxonômica entre as duas famílias (Rubiaceae e Solanaceae), além dos resultados experimentais que associam o aumento de transcritos e/ou proteínas do tipo SK<sub>n</sub> à mecanismos de aclimação ao frio, pôde-se inferir que em suspensão celular de café, aparentemente, o gene CaDh3 não está envolvido na resposta ao estresse osmótico (fig. 10 B). Contudo, este gene poderia desempenhar função essencial durante o desenvolvimento da planta, sendo expresso de forma constitutiva sob condições normais de crescimento, conforme observado nas suspensões celulares de café.

#### **4.3.2. Aquaporinas**

A especificidade no padrão de expressão das AQP's de plantas também pode estar associada às diferentes isoformas dessas proteínas, tal como observado para  $\alpha$ -TIP em sementes de feijão (Johnson *et al.*, 1990), NIP2;1 em raízes jovens de *A. thaliana* (Mizutani *et al.*, 2006) e ZmPIP2;1 e ZmPIP2;5 em células específicas das raízes de milho (Hachez *et al.*, 2006), enquanto outras isoformas podem ser expressas constitutivamente nos diversos órgãos/tecidos da planta.

A regulação transcricional das AQP's por fito-hormônios (ABA) ou estímulos ambientais como baixas temperaturas, déficit hídrico, salinidade, luz e deficiência nutricional tem sido observada em várias espécies de plantas (Suga *et al.*, 2002; Gaspar *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2004; Lian *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2004; Mizutani *et al.*, 2006). Com efeito, importante associação entre os níveis de expressão de genes de AQP's e a regulação do transporte de água em células e tecidos vegetais tem sido verificada sob condições de variação de luz (controle circadiano), conforme observado para um gene homólogo PIP2 em células motoras de *Samanea saman* (Moshelion *et al.*, 2002) e para ZmPIP1;5 *b* em raízes primárias e secundárias de milho (Gaspar *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, a análise do padrão de expressão das AQPs em *C. arabica* indicou a presença de transcritos dos genes “PIP” e “TIP”, provenientes de cerca de 30 bibliotecas (Figs. 11 A e 11 B). Sequências homólogas a essas subfamílias de AQPs foram abundantemente acumuladas nas bibliotecas LP1 (plântulas) / SS1 (pool de tecidos de plantas irrigadas) e, secundariamente, em órgãos como botão floral (FBs) e frutos imaturos (“chumbinhos”) (FR1 e FR2) que apresentaram um perfil de expressão intermediário e decrescente, com níveis mais elevados de acúmulo nas bibliotecas FBs, seguido de progressiva redução ao longo do desenvolvimento da flor até o estágio de “chumbinho”. A análise isolada das bibliotecas de folhas jovens (LV4 e LV5) e maduras (LV8 e LV9) apontou maior abundância de transcritos dos genes “PIP” e “TIP” nas folhas maduras que em folhas jovens.

Em *C. canephora*, a partir das bibliotecas geradas pelo consórcio Cornell-Nestlé (Lin *et al.*, 2005), níveis mais elevados de expressão de “PIP” foram observados em tecidos como pericarpo (PP1) e folhas (LF1), enquanto nos grãos (SEs) verificou-se uma clara tendência à queda na expressão de “PIP” associada aos estágios mais tardios de desenvolvimento dos frutos (fig. 11 C). Transcritos de genes da subfamília “TIP” também foram preferencialmente acumulados em PP1 e um padrão intermediário de expressão foi encontrado nas bibliotecas de folhas (LF1) e grãos imaturos (SE2 e SE3), conforme mostra a fig. 11 D. A expressão de AQPs detectada na biblioteca SH3 (folhas de clone tolerante sob estresse hídrico) foi relativamente baixa para os genes “PIP” e “TIP” (figs. 11 C e 11 D).

As figs. 11 E e 11 F indicam que os genes “PIP” e “TIP” foram expressos em frutos de *C. racemosa* (FV2 e FR4).

Conforme observado em café, diferentes abundâncias no conteúdo de AQPs estiveram associadas a distintos estágios de desenvolvimento do mesmo órgão ou tecido, como por exemplo, nas bibliotecas de botão floral (FBs), folhas (LVs) e frutos imaturos de café arábica (FR1 e FR2) e em grãos de café robusta (fig. 11 A-D).

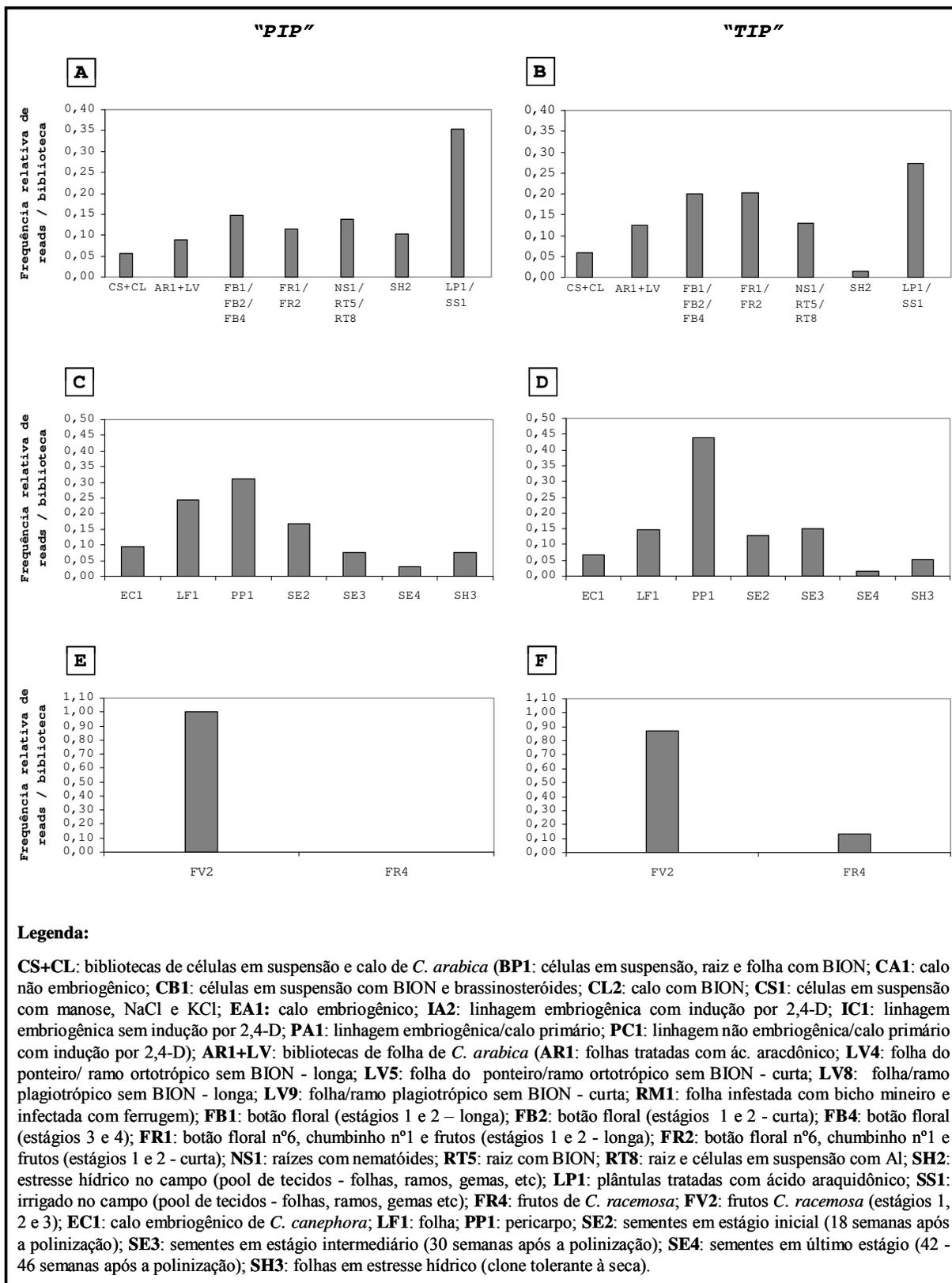


Figura 11. Northern eletrônico das aquaporinas “PIP” e “TIP” identificadas em *C. arabica* (A e B), *C. canephora* (C e D) e *C. racemosa* (E e F). Sequências obtidas junto aos bancos do projeto EST-Genoma Café e do consórcio Cornell- Nestlé.

Tal constatação sugere uma regulação diferencial das AQPs em função de exigências hídricas variáveis relativas a diferentes estágios de desenvolvimento de um tecido e/ou órgão, o que por sua vez reforça a participação dessas proteínas na manutenção do balanço hídrico celular (e/ou outras pequenas moléculas e íons). Neste sentido, os múltiplos genes de AQPs constituem importante estratégia das plantas para modular a expressão em diferentes tecidos, células e estruturas intracelulares ao longo do desenvolvimento, sob condições de estímulos externos e em resposta a alterações na demanda do fluxo da água (Heymann & Engel, 1999; Maurel *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2003; Chaumont *et al.*, 2005).

Estudo realizado por Alexandersson *et al.* (2005) avaliou o perfil de expressão de todas as 35 AtMIPs por análise de microarranjos em folhas da roseta de *Arabidopsis* comparativamente a outros tecidos como raízes e flores. Algumas isoformas foram expressas especificamente em raízes ou flores, enquanto nenhuma foi específica de folhas. De maneira geral, a expressão de AQPs nas raízes foi mais intensa do que nas folhas, o que sugere a importância dessas proteínas para a tomada de água pelas raízes.

Jang *et al.* (2004) avaliaram o padrão de expressão das 13 AtPIPs em plântulas de *A. thaliana* mantidas sob condições normais de crescimento ou submetidas a estímulos externos diversos e verificaram que as PIPs foram reguladas diferencialmente, elevando ou diminuindo sua expressão, em função do órgão vegetal (parte aérea ou raiz) e também do estímulo externo (frio, seca, alta salinidade e ABA). Essas evidências sugerem que diferentes AQPs podem ser recrutadas em diferentes escalas de tempo (durante as fases do desenvolvimento) e espaço (tecidos ou órgãos) e que cada gene é regulado de maneira distinta envolvendo as rotas de sinalização ABA-dependente e ABA-independente (Jang *et al.*, 2004).

A manipulação genética de AQPs em plantas parece constituir uma importante estratégia para a elucidação das funções dessas proteínas na célula. Com efeito, resultados obtidos em tabaco e *A. thaliana* utilizando construções antisense para genes PIPs indicaram a

incapacidade das plantas recuperarem-se após o estresse hídrico, sugerindo a importância crítica dessas proteínas durante esse processo (Martre *et al.*, 2002; Siefritz *et al.*, 2002). Estudo desenvolvido por Lian *et al.* (2004) envolveu uma PIP de arroz (RWC3) cuja expressão era induzida por alterações osmóticas especificamente em uma cultivar de arroz tolerante à seca. Adicionalmente, os autores demonstram que a super-expressão desse gene em uma cultivar sensível à seca, sob controle de um promotor induzível por seca, foi capaz de melhorar o desempenho dessa cultivar sob condição de estresse (Lian *et al.*, 2004).

O presente estudo avaliou a expressão de AQPs em células de café arábica submetidas a estresse osmótico com PEG (figs. 12 e 13). De modo geral, os resultados obtidos não demonstraram acúmulo diferenciado de transcritos dos genes PIP1, PIP2;1, PIP2;2 e TIP1 sob condição de estresse, embora CaPIP2;2 tenha apresentado uma leve aumento de expressão entre 8 e 24 h de tratamento com PEG, além de exibir a maior intensidade de resposta entre as AQPs analisadas (fig. 13 C). O gene CaPIP2;1 também tendeu a se acumular ao longo do tempo, apesar de não ter sido verificada expressão diferencial entre os tratamentos com ou sem PEG (fig. 13 B). Tais observações reforçam o maior envolvimento do subgrupo 2 das proteínas PIP (PIP2) no transporte de água através da membrana, conforme comprovado por estudos sobre a atividade de canal de água das AQPs via expressão heteróloga de PIP2s de plantas em oócitos de *X. laevis* (Johansson *et al.*, 1998; Chaumont *et al.*, 2000).

Os genes CaPIP1 e CaTIP1 não responderam diferencialmente ao estresse osmótico e apresentaram expressão constitutiva, não exibindo variações significativas em função do tempo de tratamento (fig. 13 A e 13 D).

Embora os resultados para a análise de expressão das AQPs em suspensão de células de café não tenham mostrado alteração sob condição de estresse osmótico, fatores como a atividade diferenciada de cada isoforma de AQP em plantas, além de possíveis regulações pós-transcricionais e do controle diurno/circadiano, precisam ser considerados nessa discussão.

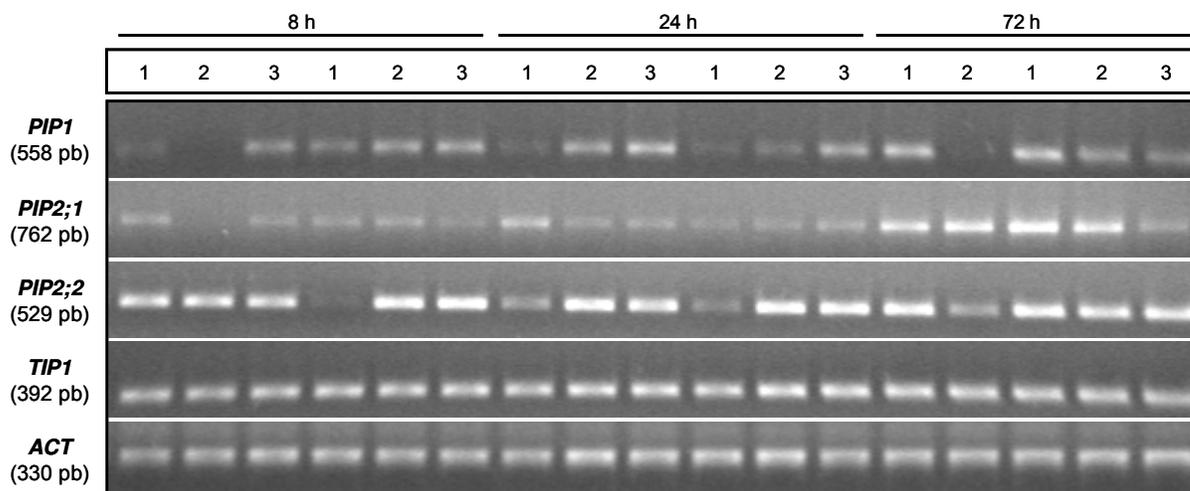


Figura 12. RT-PCR semi-quantitativa para as AQPs (PIP1, PIP2;1, PIP2;2 e TIP1) em suspensão celular de *C. arabica*. Para cada tempo de tratamento (8, 24 ou 72 h) estão indicadas as amostras controle 0% PEG (identificadas por um número seguido da letra c) e as amostras sob estresse osmótico 15% PEG (identificadas apenas por um número). ACT indica o gene normalizador da PCR. Os tratamentos estão em triplicatas (exceção para o tratamento controle às 72 h).

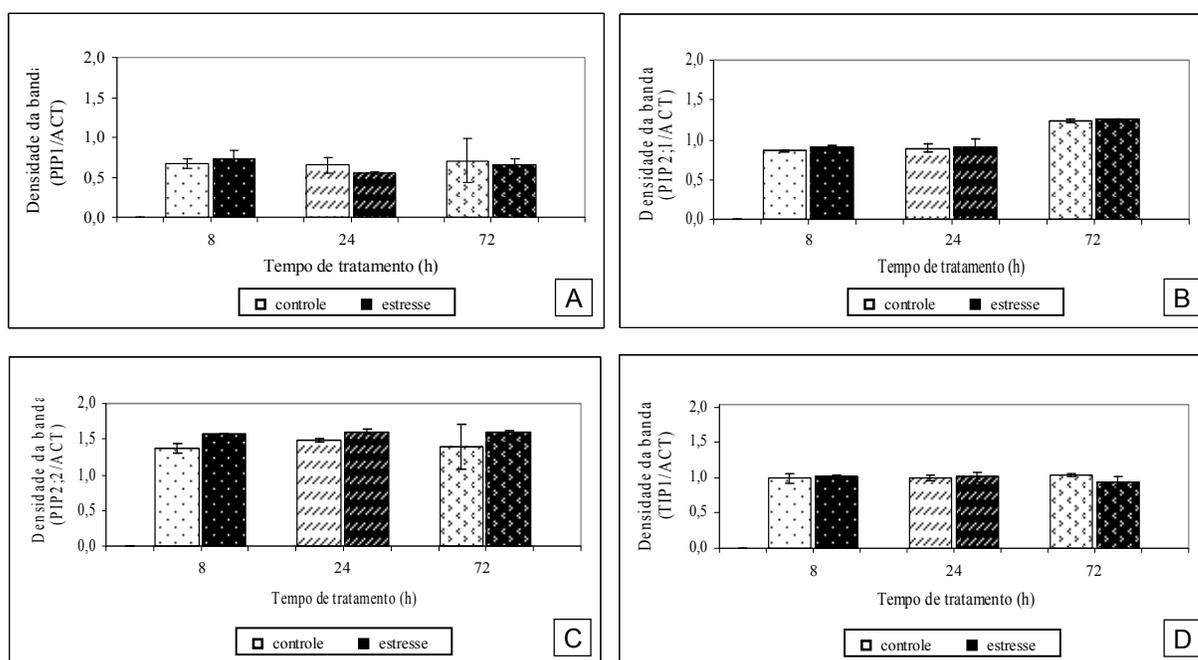


Figura 13. Normalização da expressão dos genes CaPIP1, CaPIP2;1, CaPIP2;2 e CaTIP1 em função do gene ACT (actina) de expressão constitutiva em suspensão de células de *C. arabica* (n = 3; barra = desvio padrão).

A relação entre nível de mRNA e acúmulo de proteína correspondente pode não seguir um padrão linear. Estudo conduzido em raízes de *Raphanus sativus* (rabanete) verificou que a abundância de transcritos de isoformas de PIP2 foi elevada transientemente em resposta a estresse osmótico, enquanto isoformas de genes TIP exibiram expressão constitutiva. Análises posteriores dos níveis de proteínas de todas essas isoformas mantiveram-se constantes, sugerindo a ocorrência de modificações pós-transcricionais (Suga *et al.*, 2002; Suga, *et al.*, 2003).

A expressão de alguns genes oscila no período de 24 horas, indicando que o ciclo dia-noite atua como um mecanismo de regulação gênica (Schaffer *et al.*, 2001). Dessa forma, possíveis influências decorrentes das condições particulares da cultura de tecidos (principalmente o fator ausência de luz) poderiam, em parte, explicar a aparente não correlação entre estresse osmótico e expressão de AQPs observada nas suspensões celulares de café. Com efeito, variações no padrão de expressão de AQPs associadas ao ciclo luz-escuro têm sido descritas em plantas como *Lotus japonicus* e milho, nas quais maiores intensidades no transporte de água nas raízes em torno do meio-dia foram correlacionadas a um substancial aumento na abundância de transcritos de PIP1 e PIP2 (Henzler *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 2003). Em milho, transcritos de *ZmPIP1;5* foram identificados em todos os tipos celulares da raiz durante o dia, porém à noite, a expressão permaneceu restrita às células da epiderme (Gaspar *et al.*, 2003). Os mecanismos que permitem a percepção da luz e o controle a longa distância da expressão de AQPs nas raízes das plantas são desconhecidos e necessitam maiores investigações (Maurel *et al.*, 2008).

#### **4.4. Caracterização da tolerância à seca em plantas de *Coffea***

Os centros de origens das espécies de café são caracterizados por uma alta disponibilidade de água, fato esse que provavelmente possibilitou uma evolução sem a

necessidade de desenvolvimento de sofisticados mecanismos para enfrentar o estresse hídrico (Coste, 1992; Rena *et al.*, 1994). Atualmente, várias cultivares de café são reconhecidas por apresentarem respostas diferenciadas à seca, evidenciando distintos graus de tolerância (Carr, 2001; DaMatta & Rena, 2001; Alfonsi *et al.*, 2005).

Vários estudos apontam que o maior componente da adaptação diferencial à seca entre genótipos dos cafés arábica e robusta é comportamental e pode ser controlado pelas taxas de uso da água e/ou eficiência na captação da água no solo (Meinzer *et al.*, 1990; DaMatta *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2005). Com efeito, estudos comparativos sob condições controladas e no campo evidenciaram que genótipos tolerantes eram mais hábeis em manter elevado o  $\Psi_w$  e/ou seu conteúdo relativo de água (RWC) do que os genótipos sensíveis, sob condição de déficit hídrico (Meinzer *et al.*, 1990; DaMatta *et al.*, 2000, 2003; Pinheiro *et al.*, 2005).

Segundo Passioura (1997), a adaptação à falta d'água é considerada uma característica multigênica, que envolve inúmeros mecanismos complexos cujo controle e base molecular são pouco compreendidos. Particularmente no caso das plantas cultivadas, é necessário estabelecer uma real correspondência entre a produtividade e os mecanismos de tolerância sob estresse hídrico, uma vez certas adaptações para a sobrevivência tendem a reduzir a produção das culturas (Richards, 1997). Em café, estudo desenvolvido por Mazzafera & Carvalho (1987) destacou a importância de se estabelecer uma correlação entre tolerância à seca e produtividade, especialmente quando se trata de plantas cultivadas, uma vez que resultados obtidos pelos autores em plantas de campo indicaram que certas progênies pouco produtivas mostraram-se tolerantes à seca.

#### **4.4.1. Experimento I: Caracterização da murcha foliar em cafeeiros e sua correlação com o potencial hídrico**

A diminuição da disponibilidade de água pode ser quantificada como uma redução no  $\Psi_w$  (Kramer & Boyer, 1995).

Espécies de *Coffea*, sob condições de déficit hídrico, mantêm alto conteúdo relativo de água na folha (RWC) sendo consideradas “poupadoras d’água” assim como espécies tolerantes sob desidratação (DaMatta *et al.*, 1993), o que poderia ser atribuído a um eficiente controle estomático da transpiração (Pinheiro *et al.*, 2005) e/ou à baixa elasticidade da parede celular (Meinzer *et al.*, 1990; DaMatta *et al.*, 1993, 2003; Pinheiro *et al.*, 2005). Deste modo, a partir dos aspectos de murcha foliar observados em plantas de café submetidas a estresse hídrico por suspensão da irrigação, foi possível estabelecer uma correspondência com o seu respectivo grau de desidratação, através da medição do  $\Psi_w$  (figs. 14 e 15).

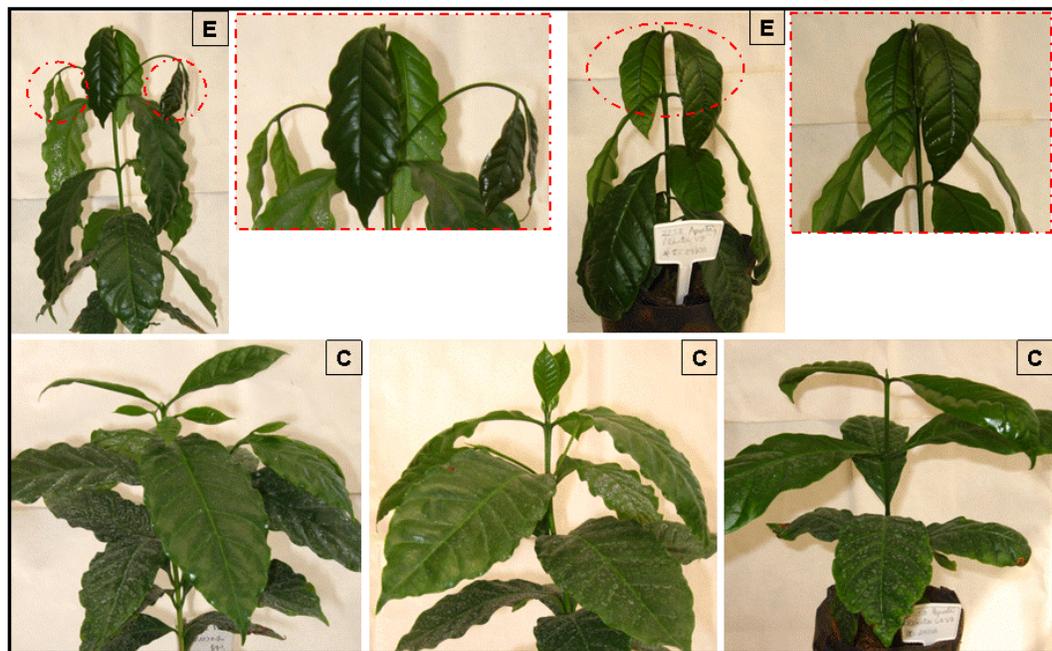


Figura 14. Determinação do ponto de murcha em plantas de café. As fotos mostram o fenótipo de murcha indicativo de estresse aproximado de  $-2,0$  MPa ( $\Psi_{pd}$ ) em cafeeiros jovens (com idade de 11 meses). Em destaque são apontadas folhas jovens do ápice e dos ramos laterais de plantas sob estresse hídrico (E) e controle irrigado (C).

O grau de desidratação imposto às plantas de café caracterizou um estresse moderado (aproximadamente -2,0 MPa) após um período 10-14 dias a partir da suspensão da irrigação. A fig. 15 mostra que os valores do  $\Psi_{pd}$  (6 h) obtidos para os genótipos de café permaneceram em torno de  $-2,15 \pm 0,15$ , enquanto nas plantas irrigadas esse valor foi cerca de  $-0,17 \pm 0,02$ .

O valor médio do  $\Psi_w$  ao meio-dia ( $\Psi_{md}$ ) foi bastante variável entre os genótipos de café sob estresse hídrico (fig. 15). Inicialmente, notou-se que as plantas controle apresentaram menores  $\Psi_w$  às 12h que às 6 h. Com as plantas estressadas isto também ocorreu, mas em maior escala. Comparando os  $\Psi_w$  entre as medidas tomadas às 6h e às 12h, as cultivares de café arábica sofreram as maiores reduções, com Catuaí Vermelho atingindo um  $\Psi_{md}$  em torno de -2,67 MPa (redução de 21,4%), seguida por Mundo Novo com  $\Psi_{md}$  médio igual a -2,43 MPa (redução de 14,8%). Tanto Aipoatã como a enxertia MN/Aipoatã apresentaram reduções em torno 12,5% no  $\Psi_w$  durante o período, sendo que os  $\Psi_{md}$  aproximados foram de -2,63 MPa e -2,48 MPa, respectivamente (fig. 15).

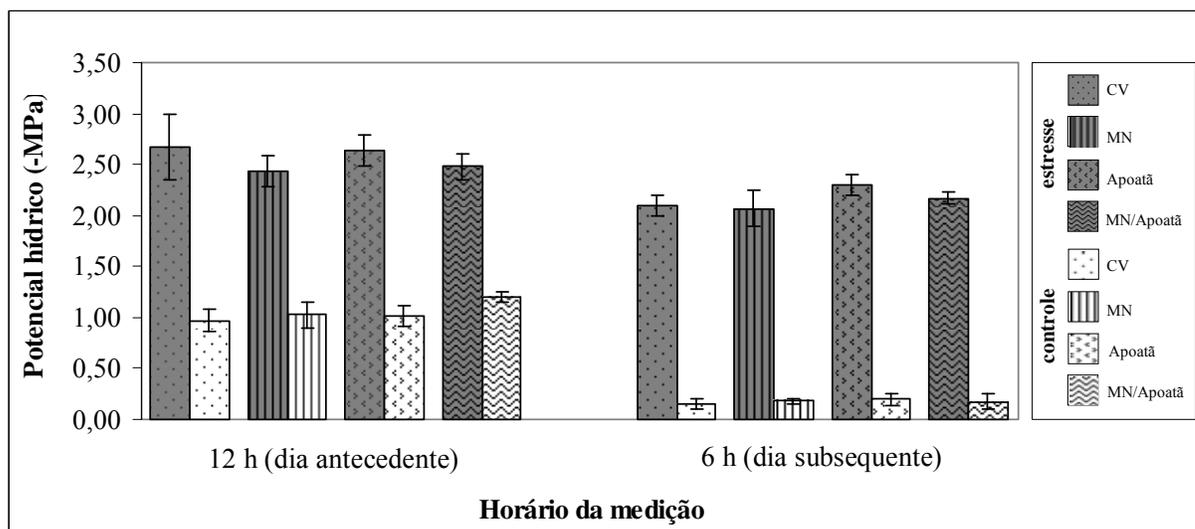


Figura 15. Determinação do potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) das plantas de café com idade de 11 meses submetidas a estresse hídrico (exp. I). O  $\Psi_w$  foi medido em folhas completamente expandidas do 2º ou 3º nós do ápice caulinar. CV = cv. Catuaí Vermelho (*C. arabica*); MN = cv. Mundo Novo (*C. arabica*); Aipoatã = cv. Aipoatã (*C. canephora*) e MN/Aipoatã = enxertia Mundo Novo (copa) sobre Aipoatã (porta-enxerto). n = 3; barra = desvio padrão.

Esses dados sugerem que as cultivares de *C. arabica* parecem ser mais sensíveis à baixa disponibilidade de água no solo quando comparadas à cv. Apoatã (*C. canephora*) e à enxertia MN/Apoatã, o que, a princípio, poderia ser resultado de uma menor eficiência na captação de água do solo (profundidade e superfície das raízes), já que as plantas enxertadas exibiram menores taxas de redução no  $\Psi_w$  em relação ao pé franco da cv. Mundo Novo.

Estudos realizados por Fahl *et al.* (2001 a, b) verificaram maiores taxas de transpiração e condutância estomática em “Apoatã” do que nas cultivares de café arábica, o que foi atribuído à maior eficácia na absorção de água e maior profundidade de seu sistema radicular. Essa maior eficiência na captação de água pelo sistema radicular de “Apoatã” foi verificada também em plantas de *C. arabica* enxertadas sobre aquela cultivar, indicando, por conseguinte, a menor eficiência do sistema radicular das espécies de café arábica.

Nas plantas irrigadas a variação no  $\Psi_w$  entre as 6 h e 12 h foi bastante elevada, nas quais o  $\Psi_{md}$  aproximou-se de -1,00 MPa nas plantas pé franco e -1,20 MPa em cafeeiros enxertados. A elevada redução no  $\Psi_w$  (80-85%) verificada nas folhas dos cafeeiros irrigados às 12 h pode ser associada às maiores taxas transpiratórias decorrentes do maior aquecimento das folhas para esse período do dia que, conseqüentemente, conduz a planta a um balanço hídrico negativo em torno de -1,00 MPa (Pinheiro *et al.*, 2005), que será mantido até o final da tarde quando então a menor demanda atmosférica possibilitará a recuperação do estado normal de turgescência das folhas.

#### **4.4.2. Experimento II: Avaliação da tolerância à seca em cafeeiros**

##### ***Potencial hídrico de cafeeiros submetidos à seca***

Estabelecida uma correlação entre o aspecto geral de murcha foliar e valores médios de  $\Psi_w$  em torno de -2,00 MPa (“predawn”) em cafeeiros submetidos a estresse hídrico

(experimento I), foi conduzido um novo experimento com plantas de café de cerca de 11 meses. O  $\Psi_w$  foi tomado apenas às 12 h (no dia da coleta) e seu valor médio foi de  $-2,46 \pm 0,09$  MPa (plantas sob estresse) e  $-1,10 \pm 0,09$  MPa (plantas irrigadas) (fig. 16).

A maior variação no  $\Psi_{md}$  entre plantas irrigadas e sob estresse foi observado na cv. Aboatã ( $-0,99$  MPa e  $-2,57$  MPa, respectivamente), enquanto a menor diferença foi verificada em Catuaí Vermelho, na qual o  $\Psi_{md}$  médio foi de  $-1,07$  MPa e  $-2,34$  MPa, respectivamente, nas plantas irrigadas e sob estresse hídrico (fig. 16). Mundo Novo e a enxertia MN/Aboatã apresentaram variações similares em torno de  $-1,17$  MPa (plantas irrigadas) e  $-2,45$  MPa (plantas sob estresse). Aparentemente, a maior redução no  $\Psi_w$  observada em “Aboatã” (*C. canephora*) em relação às cultivares de café arábica deve-se, não apenas a um maior esgotamento da água no solo ao redor de seu sistema radicular mas, principalmente, por sua baixa habilidade em controlar a perda de água pelas folhas, conforme reportado por Fahl *et al.* (2001 a) e Alfonsi *et al.* (2005).

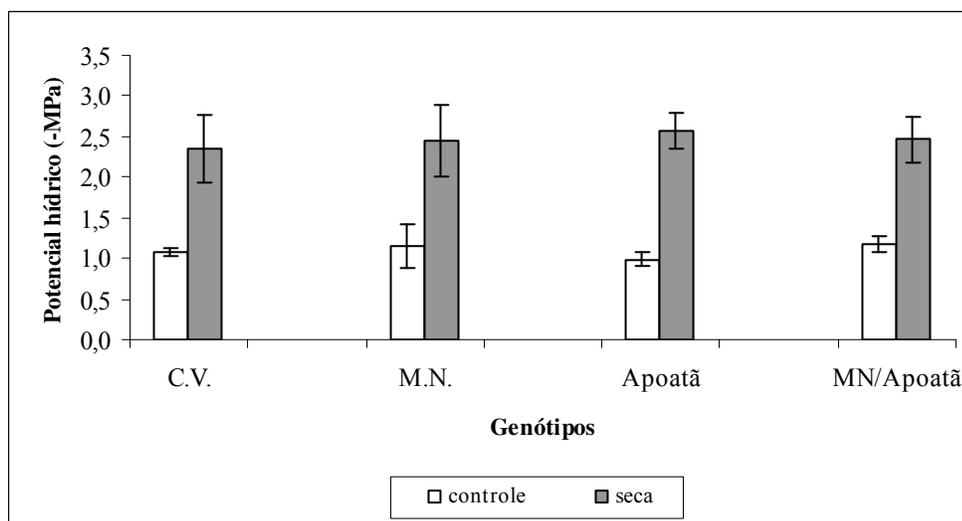


Figura 16. Determinação do  $\Psi_w$  médio às 12 h em plantas de café com idade de 11 meses submetidas a estresse hídrico (exp. II). C.V. = cv. Catuaí Vermelho (*C. arabica*); M.N. = cv. Mundo Novo (*C. arabica*); Aboatã = cv. Aboatã (*C. canephora*) e MN/Aboatã = enxertia de Mundo Novo (copa) sobre Aboatã (porta-enxerto). barra = desvio padrão; n = 4.

### ***Biometria de cafeeiros submetidos à seca***

Os efeitos do estresse hídrico no crescimento das plantas não foram significativos para alguns dos parâmetros avaliados devido ao curto período de imposição do déficit hídrico (10-14 dias). Além disso, a restrição ao volume de solo determinado pelo tamanho do vaso (4,0 L) poderia ter influenciado nas medidas de crescimento obtidas pelo experimento II, afetando o pleno desenvolvimento das raízes. Resultados obtidos por Ronchi *et al.* (2006) em plantas de *C. arabica* crescidas em vasos de diferentes tamanhos (3,0; 10,0 ou 24,0 L), por um período de 115 ou 165 dias, mostraram que o crescimento e a taxa fotossintética sofreram significativas reduções em plantas com maior restrição de solo (vasos de 3,0 L).

A fig. 17 A mostra que o déficit hídrico afetou o crescimento em altura apenas em Apoatã. Embora a significância estatística não tenha sido verificada, sob condição irrigada, observou-se uma contribuição positiva da enxertia para o desenvolvimento da parte aérea do café arábica em relação ao pé franco, corroborando resultados obtidos por Fahl *et al.* (1998).

O comprimento da raiz não apresentou diferenças significativas entre plantas sob estresse e irrigadas para nenhum dos genótipos (fig. 17 B). Entretanto, ainda que a raiz principal dos cafeeiros não tivesse sido limitada pelo tamanho do vaso, não se pode desconsiderar um possível efeito negativo do tamanho e/ou volume restrito de solo sobre o crescimento em profundidade ou lateral das raízes das plantas (Ronchi *et al.*, 2006).

A razão R/PA para todos os genótipos sob estresse foi similar ou maior que nas plantas irrigadas (fig. 17 C), sendo que Catuaí Vermelho mostrou diferença significativa entre plantas irrigadas e sob estresse hídrico. As maiores proporções R/PA foram exibidas pelas cultivares Catuaí Vermelho e Apoatã, fato esse relacionado ao menor porte aéreo desses genótipos. Novamente, constatou-se a correlação positiva entre a enxertia e o maior vigor dos cafeeiros enxertados (medido pelo ganho em altura), o qual foi mantido inalterado mesmo sob condição de déficit hídrico.

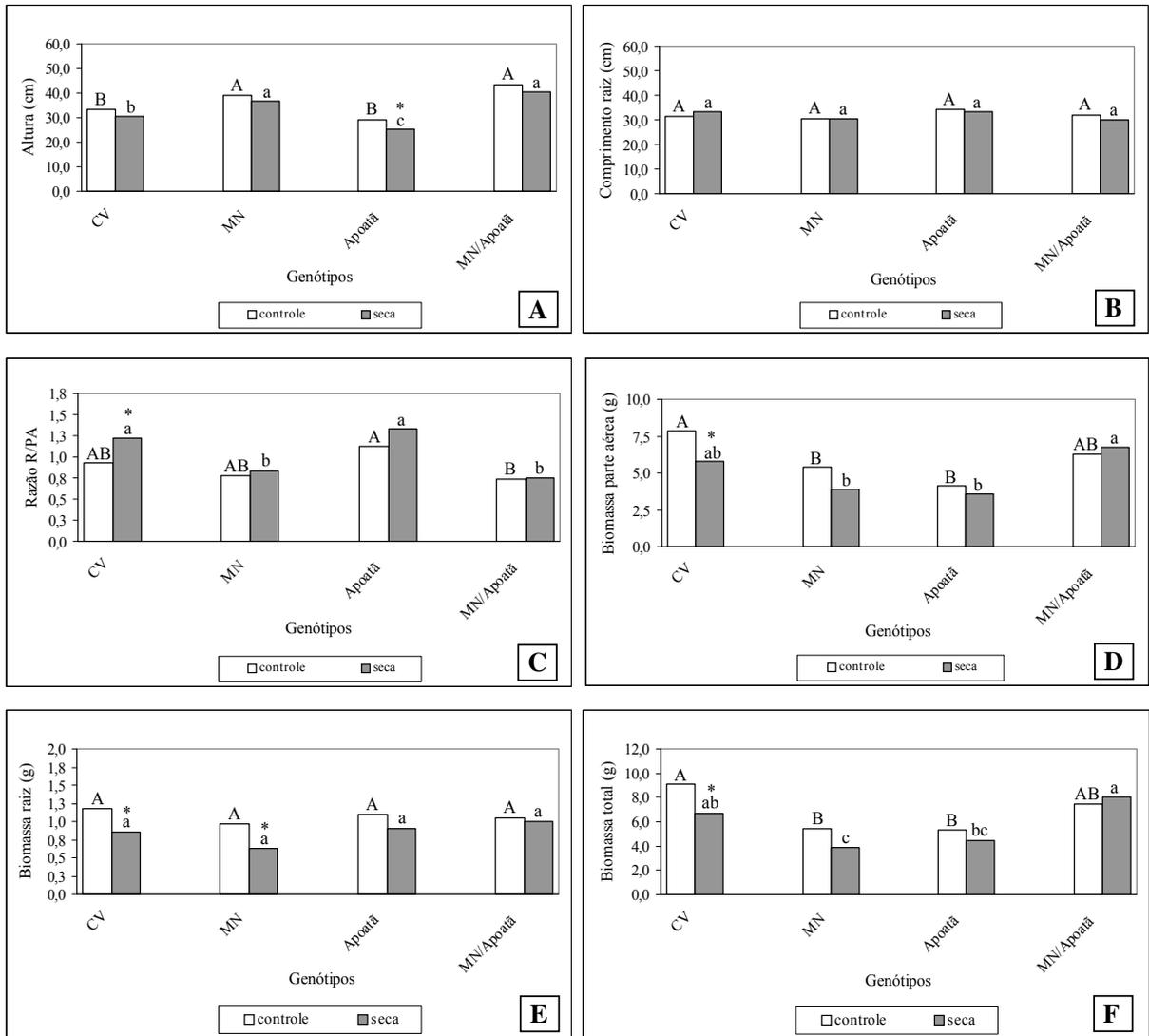


Figura 17: Determinação dos parâmetros biométricos em plantas de café submetidas a estresse hídrico (exp. II). Foram feitas medidas de altura da parte aérea (A), comprimento da raiz principal (B), razão raiz/parte aérea (C), biomassa da parte aérea (D), biomassa da raiz principal (E) e biomassa total (F). As letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as médias para as plantas irrigadas e as minúsculas representam diferenças significativas entre as médias das plantas sob estresse hídrico pelo teste de Tukey com  $p \leq 0,05$  ( $n = 4$ ). O asterisco indica diferença estatística entre plantas irrigadas e sob estresse em um mesmo genótipo. C.V. = cv. Catuaí Vermelho (*C. arabica*); M.N. = cv. Mundo Novo (*C. arabica*); Apatã = cv. Apatã (*C. canephora*) e MN/Apatã = enxertia de Mundo Novo (copa) sobre Apatã (porta-enxerto).

Entre os genótipos sob estresse, as cultivares de café arábica apresentaram as maiores reduções no acúmulo de biomassa foliar em relação aos respectivos controles irrigados (17 D), embora apenas em Catuaí tenha sido verificada redução significativa (26,3%). A biomassa da

raiz (mensurado com base apenas na raiz principal) também foi significativamente reduzida em ambas as cultivares de café arábica, sendo 27,7% em Catuaí e 35,9% em Mundo Novo (17 D e 17 E). Em Apoatã foram observadas reduções intermediárias de cerca de 12,8% na biomassa da parte aérea e 18,2% na raiz, enquanto as plantas enxertadas MN/Apoatã exibiram as menores perdas na produção de biomassa (apenas 4,8% na raiz), indicando que enxertia melhorou o desempenho das plantas de café sob déficit hídrico (17 D e 17 E) em relação ao pé franco Mundo Novo. Os melhores índices de crescimento observados nas plantas de café enxertadas devem estar diretamente correlacionados às características do sistema radicular do café robusta, devido à sua maior capacidade em explorar o perfil do solo (Fahl *et al.*, 2001 a, b; Pinheiro *et al.*, 2005).

#### **4.4.3. Experimento III: Caracterização do sistema radicular de cafeeiros irrigados**

Com o propósito de melhorar a caracterização dos parâmetros biométricos dos cafeeiros, principalmente aqueles relacionados ao sistema radicular, novas medidas foram realizadas em plantas de café com cerca de 12 meses (em vaso) sob condições normais de irrigação.

Assim, de acordo com a tabela 4, pôde-se melhor caracterizar a diferença entre a altura das cultivares de café arábica, com Mundo Novo superando em aproximadamente 20% o porte médio de Catuaí Vermelho. A interação estabelecida pela enxertia foi positiva e potencializou em quase 14% o crescimento em altura das plantas enxertadas em relação às não enxertadas correspondente ao pé franco da cv. Mundo Novo.

A contribuição positiva resultante da enxertia também pode ser observada pelo acúmulo total de biomassa, onde o ganho foi de 28% em relação à cv. Mundo Novo, o que em grande parte pode ser atribuído ao aumento em altura das plantas enxertadas. Esses resultados confirmam a contribuição benéfica do porta-enxerto de Apoatã (café robusta) para melhorar o

desempenho da copa de café arábica, o que além de relacionar-se fortemente à maior habilidade em explorar o perfil do solo devido à maior profundidade alcançada pelas raízes, poderia ainda ser explicada por uma seletividade diferencial de micro e macronutrientes pelo sistema radicular do porta-enxerto (Fahl *et al.*, 1998; Alfonsi *et al.*, 2005).

Tabela 4: Caracterização morfológica de cafeeiros sob condição normal de irrigação.

Parâmetros	Genótipos*		
	Catuai Vermelho (IAC81)	Mundo Novo (IAC464)	Enxertia M. Novo/Apoatã
Altura (cm)	40,000 ± 1,275 <b>c</b>	49,840 ± 2,589 <b>b</b>	57,800 ± 2,775 <b>a</b>
Raiz / Parte aérea	0,880 ± 0,084 <b>a</b>	0,700 ± 0,071 <b>b</b>	0,640 ± 0,114 <b>b</b>
Biomassa total (g)	26,140 ± 0,976 <b>a</b>	18,680 ± 3,844 <b>b</b>	26,080 ± 2,291 <b>a</b>
Massa seca raiz (g)	6,640 ± 0,733 <b>a</b>	4,540 ± 0,896 <b>b</b>	6,420 ± 0,999 <b>a</b>
Profundidade raiz (cm)	35,040 ± 1,544 <b>a</b>	33,940 ± 1,998 <b>a</b>	36,700 ± 5,106 <b>a</b>
Superfície Relativa Raiz (cm <sup>3</sup> )**	139,870 ± 21,663 <b>a</b>	87,872 ± 8,734 <b>b</b>	135,520 ± 13,845 <b>a</b>

Valores indicam as médias ± desvio padrão para n= 5. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os genótipos (Teste de Tukey, p≤0,05). (\*) Plantas da cv. Apoatã (IAC2258) não foram mensuradas; (\*\*) Valor relativo ao volume de KOH (0,3 N) utilizado para a titulação.

Sob condições normais de irrigação, verificou-se que a massa seca da raiz e a superfície relativa da raiz, ambas mensuradas em função da raiz total (principal e secundárias), foram capazes de estabelecer diferenças significativas entre as cultivares de café arábica, sendo a massa 31,6% e a superfície relativa 37,2% maior em Catuai Vermelho que na cv. Mundo Novo. Novamente, segundo esses mesmos parâmetros, foi possível notar o aumento nos valores do volume de raízes nas plantas enxertadas de Mundo Novo, que deve ser semelhante ao do pé-franco de Apoatã (não mensurado), agregando às plantas enxertadas cerca de 30,0% em massa e 35,0% em superfície de raiz (tabela 4).

## 4.5. Análises Bioquímicas

Nas plantas, as alterações no metabolismo primário constituem respostas gerais a diversos tipos de estresse. Nesse sentido, as enzimas do metabolismo de açúcares possivelmente apresentem uma atividade crítica durante a tolerância à desidratação, indicando que certos açúcares podem ser essenciais para a proteção de vários organismos contra a dessecação (Ingram & Bartels, 1996). Adicionalmente, enzimas envolvidas na síntese de outros compostos denominados “compatíveis”, tais como  $\delta\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (biossíntese de prolina) e betaína aldeído desidrogenase (biossíntese de glicina betaína), podem apresentar altos níveis de transcritos durante a seca (Yoshida *et al.*, 1995; Chen & Murata, 2008).

O ajuste osmótico pode ser definido como o aumento na osmolaridade celular decorrente de uma maior concentração de solutos não-tóxicos que favorecem a entrada de água na célula, promovendo a manutenção do turgor (Zhang *et al.*, 1999).

Estudos têm proposto que o ajuste osmótico constitui um importante mecanismo de tolerância à seca (Turner, 1997) e que, inclusive, poderia ser utilizado como critério de seleção em programas de melhoramento tradicional e por engenharia genética (Blum *et al.*, 1983; Morgan, 1983; Zhang *et al.*, 1999). Por outro lado, autores como Serraj & Sinclair (2002) são contrários a isso defendendo que não há evidências suficientes para suportar a correlação entre ajuste osmótico e aumento da produtividade nas culturas, alegando que os poucos resultados experimentais publicados foram usualmente obtidos sob condições muito severas de estresse hídrico, nos quais as baixas produções inviabilizariam quaisquer comparações consistentes entre os fatores mencionados.

### 4.5.1. Análise de açúcares solúveis totais, sacarose, aminoácidos livres totais e prolina

Com o propósito de avaliar o envolvimento dos solutos compatíveis em possíveis

mecanismos de tolerância à seca em café, foram determinados os teores de compostos tais como açúcares e aminoácidos (prolina, em particular) que, neste sentido, poderiam contribuir para o ajuste osmótico e/ou desempenhar funções protetoras contra danos causados pelo déficit hídrico.

### *Em suspensão celular de café*

Resultados obtidos em suspensão celular de café arábica (cv. Catuaí Vermelho) sob estresse osmótico induzido por PEG (fig. 18) indicaram que os teores de açúcares totais (A) e sacarose (B) aparentemente não exibiram resposta diferencial ao estresse em relação ao controle ao longo de 72 h de tratamento. Uma situação semelhante foi verificada em relação às dosagens dos teores de aminoácidos (fig. 18 C e 18 D), nas quais apenas uma leve tendência de aumento no teor do aminoácido prolina às 72 h de tratamento pode ser observada.

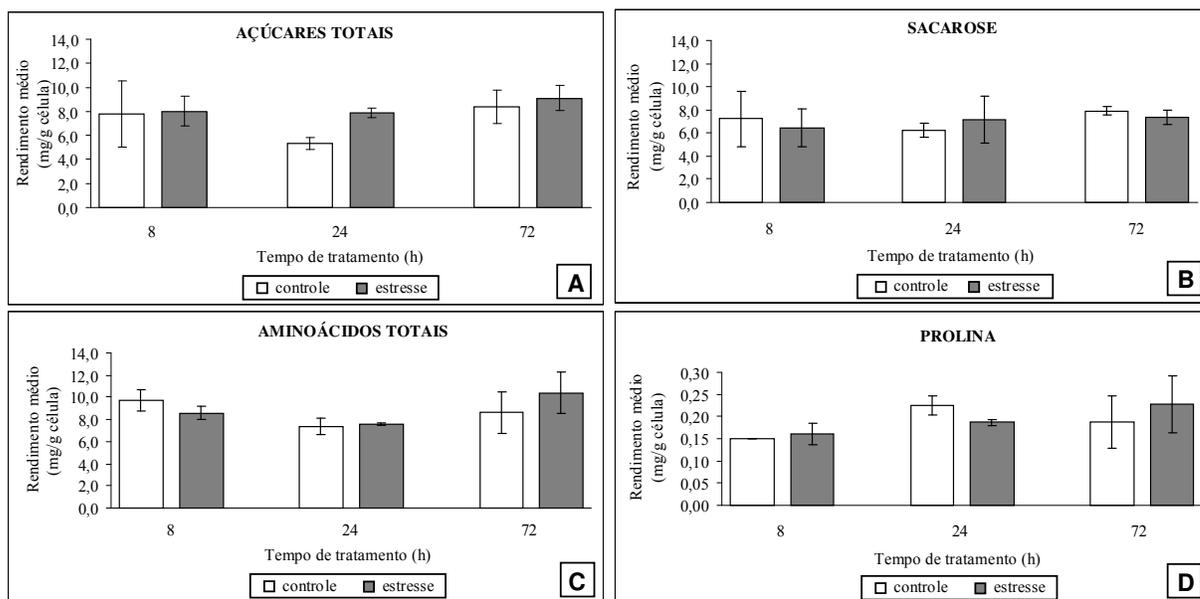


Figura 18. Análise espectrofotométrica do teor de açúcares solúveis totais (A), sacarose (B), aminoácidos livres totais (C) e prolina (D) em suspensão celular de *C. arabica* submetida a estresse osmótico (15% PEG em meio de cultura).

Desse modo, a partir do ensaio em suspensão de café não foi possível determinar qualquer correlação entre o acúmulo dos compostos analisados e o ajustamento osmótico em suspensão celular de café. Condições nas quais o ensaio em meio de cultura foi conduzido, principalmente em relação ao tempo de tratamento (máximo de 72 h) e à intensidade do estresse (cerca de -1,30 MPa), podem ter influenciado os resultados obtidos em células de café. Al-Khayri & Al-Bahrany (2004) examinando a resposta de suspensões celulares de uma espécie de palmeira submetida ao estresse osmótico, durante duas semanas, por diferentes concentrações de PEG (0 – 30%, m/v), constataram uma correlação positiva entre o ajuste osmótico mediado por prolina e concentrações crescentes de PEG.

### ***Em plantas jovens de café***

Em plantas de café, sob condições normais de irrigação, o conteúdo de açúcares solúveis totais nas folhas foi maior que aquele observado para as plantas sob déficit hídrico de -2,0 MPa (fig. 19) e, em média, manteve-se em torno de 60,6 mg/g de tecido entre os genótipos.

Entre as plantas sob estresse, as cultivares de café arábica demonstraram significativas reduções no conteúdo de açúcares totais na folha em relação ao controle, cerca de 23,0% em Catuaí Vermelho e 43,8% em Mundo Novo, enquanto as reduções exibidas por Apoatã e MN/Apoatã não foram significativas (fig. 19 A). Na raiz, sob condições normais de irrigação, as taxas de açúcares totais mantiveram-se similares entre os genótipos e, sob déficit hídrico, apenas Catuaí Vermelho exibiu aumento significativo em relação ao controle (fig. 19 B), situação inversa àquela observada na folha. Tal constatação, diminuição de açúcares na folha e aumento na raiz, observada em Catuaí Vermelho poderia sugerir uma possível participação desses compostos no ajuste osmótico nas raízes, uma vez que o aumento no conteúdo de sacarose nas raízes também foi verificado para essa mesma cultivar (fig. 19 D).

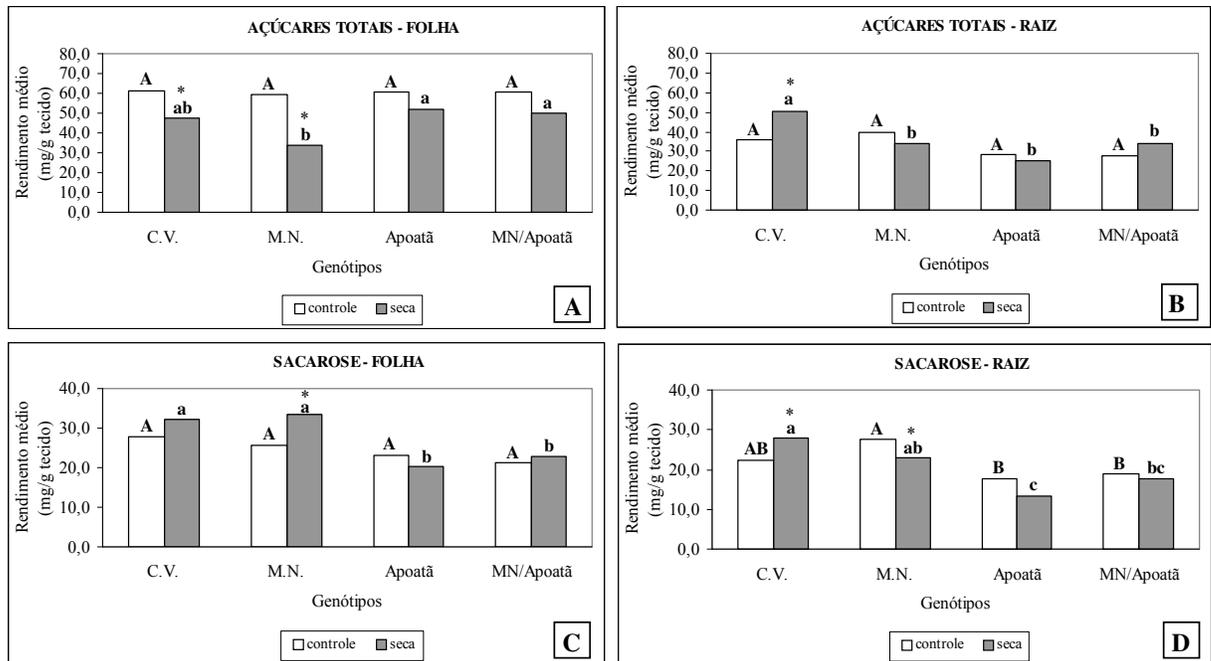


Figura 19: Determinação do teor de açúcares solúveis totais na folha (A) e na raiz (B) e de sacarose na folha (C) e na raiz (D) em plantas de café submetidas a estresse hídrico. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as médias para as plantas irrigadas e as minúsculas representam diferenças significativas entre as médias das plantas sob estresse hídrico pelo teste de Tukey com  $p \leq 0,05$  ( $n = 3$ ). O asterisco indica diferença estatística entre plantas irrigadas e sob estresse em um mesmo genótipo. C.V. = cv. Catuaí Vermelho (*C. arabica*); M.N. = cv. Mundo Novo (*C. arabica*); Aipoatã = cv. Aipoatã (*C. canephora*) e MN/Aipoatã = enxertia de Mundo Novo (copa) sobre Aipoatã (porta-enxerto).

Sob estresse hídrico moderado de cerca de -2,0 MPa, os teores de sacarose na folha não foram significativamente alterados, a exceção da cv. Mundo Novo, para a qual foi detectado aumento no conteúdo desse composto (fig. 19 C). Nas raízes, o acúmulo de sacarose sob condição de estresse mostrou uma correlação positiva apenas em Catuaí Vermelho, enquanto para os demais genótipos tal correlação não foi verificada (fig. 19 D). A manutenção do teor de sacarose nas folhas de café sob estresse hídrico poderia estar associada à menor taxa de exportação de fotoassimilados em função de uma menor demanda energética por parte dos drenos (Praxedes *et al.*, 2006).

A análise do teor dos aminoácidos totais nas folhas de cafeeiros submetidos à seca foi significativamente maior para as duas cultivares de café arábica e plantas enxertadas em

relação aos respectivos controles irrigados (fig. 20 A), enquanto nas raízes, apenas Catuaí Vermelho exibiu aumento significativo sob estresse (fig. 20 B).

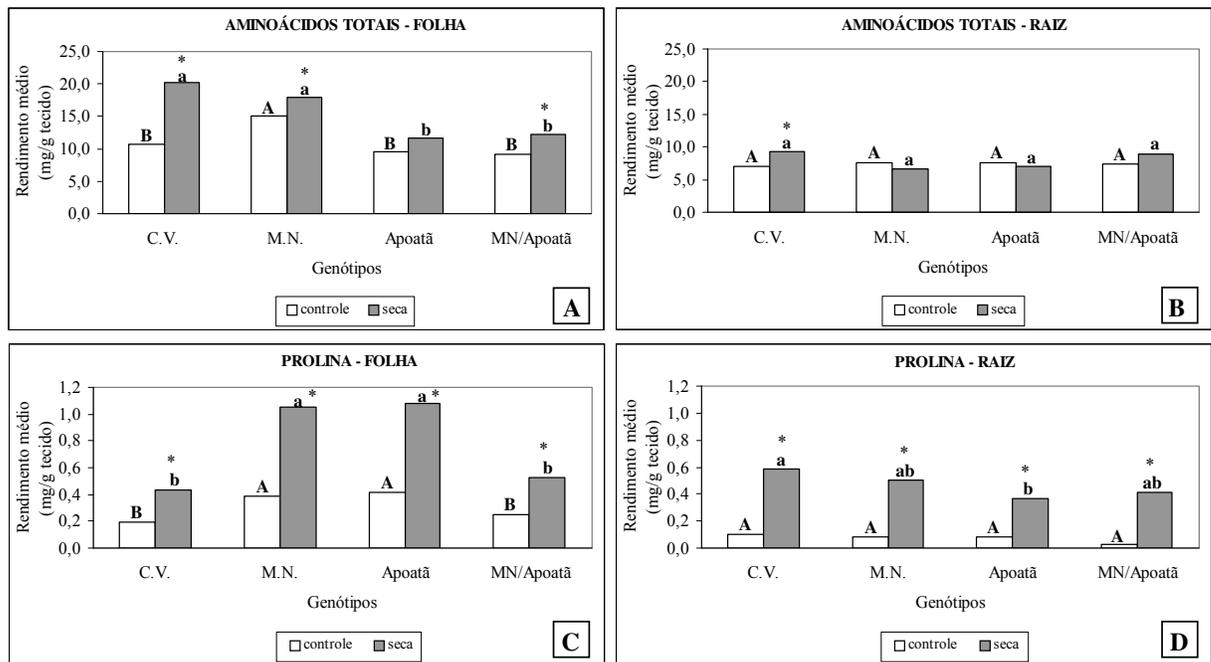


Figura 20: Determinação do teor de aminoácidos livres totais na folha (A) e na raiz (B) e de prolina na folha (C) e na raiz (D) em plantas de café submetidas a estresse hídrico. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as médias para as plantas irrigadas e as minúsculas representam diferenças significativas entre as médias das plantas sob estresse hídrico pelo teste de Tukey com  $p \leq 0,05$  ( $n = 3$ ). O asterisco indica diferença estatística entre plantas irrigadas e sob estresse em um mesmo genótipo. C.V. = cv. Catuaí Vermelho (*C. arabica*); M.N. = cv. Mundo Novo (*C. arabica*); Aipoatã = cv. Aipoatã (*C. canephora*) e MN/Aipoatã = enxertia de Mundo Novo (copa) sobre Aipoatã (porta-enxerto).

Em todos os genótipos analisados, a dosagem do teor de prolina nas folhas e na raízes das plantas de café indicou expressivo aumento desse aminoácido sob condição de estresse hídrico (fig. 20 C e 20 D). O acúmulo de prolina foi notadamente acentuado nas raízes (fig. 20 D), onde a presença desse aminoácido nas plantas sob estresse foi, em média, 6 vezes maior nas cultivares de café arábica, 4 vezes em Aipoatã e cerca de 16 vezes na enxertia MN/Aipoatã, em relação ao valor obtido nas plantas irrigadas. Nas folhas, o acúmulo de prolina foi menos variável entre os genótipos e manteve-se nas plantas sob déficit hídrico, 2,0 a 2,5 vezes o valor médio obtido nas folhas das plantas irrigadas (fig. 20 C). Entretanto, uma comparação dos

teores de prolina entre os diferentes genótipos sob déficit hídrico, mostrou aumentos muito elevados nas folhas das cultivares Mundo Novo (café arábica) e Apoatã (café robusta) que poderia sugerir uma importância maior desse aminoácido no ajuste osmótico durante o estresse moderado ou como uma resposta à injúria provocada pelo estresse (Mazzafera & Teixeira, 1989).

Embora, segundo alguns autores, o acúmulo de prolina e a tolerância à seca não demonstrem uma correlação satisfatória em cultivares de café arábica e robusta (Maestri *et al.*, 1995; Silva, 2007), o súbito aumento desse aminoácido sob condições de déficit hídrico parece atuar como um indicador sensível do status hídrico na folha (Maestri *et al.*, 1995).

#### **4.5.2. Análise qualitativa de aminoácidos por HPLC**

Sob condições desfavoráveis de crescimento como déficit hídrico, altas temperaturas, salinidade, exposição a metais pesados, deficiência nutricional etc, devido à redução da capacidade fotossintética ocorre aumento na degradação de proteínas e concomitante acúmulo de amônio nas plantas (Genshik *et al.*, 1992; Vierstra, 1993; Lea *et al.*, 2007). Sob tais circunstâncias, a síntese de aminoácidos livres, especialmente as amidas glutamina (Gln) e asparagina (Asn), é aumentada para evitar a toxicidade pelo amônio e para promover a reassimilação do nitrogênio liberado (Rabe, 1990). Em muitos casos, a Asn acumulada pode consistir em uma resposta direta ao estresse, por exemplo, contribuindo para a manutenção da pressão osmótica ou pode ser um resultado indireto da restrição à síntese de proteínas sob condição de estresse (Lea *et al.*, 2007).

O aminoácido não protéico Gaba também é conhecido por acumular-se em diversos tecidos vegetais submetidos a estresses diversos (Serraj *et al.*, 1998). Embora as funções específicas desse aminoácido em plantas ainda sejam desconhecidas, indícios apontam para a participação do Gaba na regulação do pH, no estoque (temporário) de nitrogênio, no

desenvolvimento e defesa da planta, podendo atuar ainda como um osmólito compatível ou como via alternativa para a utilização do glutamato (Shelp *et al.*, 1999).

### *Em suspensão celular de café*

Em suspensão de células de café tratadas com PEG (15% m/v) para indução de estresse osmótico não foram identificadas, de modo geral, acúmulo diferencial de aminoácidos em relação ao tratamento controle (0% PEG), conforme observado na tabela 5.

Tabela 5. Análise qualitativa de aminoácidos por HPLC em suspensão celular de café (*C. arabica*, cv. Catuaí Vermelho IAC81). Os valores expressos em mol% indicam a média para cada tratamento (C = tratamento controle 0% PEG e T = tratamento de estresse osmótico 15% PEG) com seus respectivos desvios padrões (n = 3).

AA	Trat.	Massa de AA (mol%)					
		C (8 h)	T (8 h)	C (24 h)	T (24 h)	C (72 h)	T (72 h)
Asp		1,99±0,26	1,85±0,28	2,85±1,04	2,92±1,10	2,36±0,71	2,53±0,51
Glu		5,04±0,14	6,07±0,35	6,66±0,99	6,80±1,09	8,61±0,87	8,95±0,53
Asn		50,59±2,83	49,79±3,01	57,75±2,47	53,36±4,76	39,10±8,28	42,09±4,71
Ser		5,17±0,52	4,98±0,37	4,81±1,26	4,05±0,22	7,12±0,83	6,84±0,99
Gln+His*		20,59±3,87	20,54±3,93	15,71±3,30	16,09±3,53	18,03±1,65	15,69±1,19
Gly+Thr*		0,63±0,04	0,56±0,04	0,73±0,16	0,74±0,20	0,83±0,06	0,59±0,08
Arg		5,39±1,16	5,11±0,82	3,03±0,69	3,18±0,69	8,13±2,96	9,27±1,96
Ala		6,37±1,55	6,89±1,01	6,76±1,11	4,18±1,32	9,98±5,02	9,54±2,78
Tyr		0,32±0,07	0,35±0,11	0,30±0,04	0,30±0,03	0,34±0,06	0,32±0,06
Met		0,19±0,06	0,18±0,06	0,15±0,03	0,18±0,06	0,18±0,01	0,15±0,04
Val		0,47±0,15	0,47±0,10	0,50±0,09	1,03±0,80	0,75±0,17	0,57±0,09
Phe		0,71±0,25	0,64±0,30	1,81±0,14	1,83±0,44	1,17±0,05	1,31±0,54
Ile		0,59±0,11	0,56±0,10	0,67±0,04	1,37±0,68	1,08±0,39	0,82±0,50
Leu		0,20±0,03	0,20±0,05	0,22±0,08	0,31±0,15	0,30±0,02	0,56±0,36
Lys		0,12±0,04	0,14±0,04	0,21±0,09	0,27±0,12	0,22±0,01	0,19±0,03
Gaba		1,65±0,34	1,67±0,36	2,01±0,05	1,09±0,07	1,82±0,04	1,99±0,62

(\*) picos não diferenciados na análise.

Dentre os aminoácidos que poderiam atuar como indicadores de estresse, Asn e Gaba não exibiram resposta diferenciada entre os tratamentos, de forma que apenas um leve aumento no conteúdo de ambos foi registrado a partir de 8 h (prolina não foi detectada por esse método). O conteúdo de Asn nas células de café (independentemente do tratamento)

representou cerca de 50% do total de aminoácidos livres, indicando que esse aminoácido do mesmo modo como em leguminosas (Lea *et al.*, 2007), parece funcionar como forma preferencial de transporte de nitrogênio em células de café crescidas *in vitro*.

Novamente, a ausência de resultados consistentes em relação ao perfil de aminoácidos em células de café poderia estar relacionada a fatores como tempo (72 h de tratamento) e/ou à intensidade de estresse (diferença em torno de -0,40 MPa entre os tratamentos controle e estresse), não podendo ser tomada como definitiva. Com efeito, Serraj *et al.* (1998) avaliaram o acúmulo de Gaba e a respectiva atividade da enzima GAD (glutamato descarboxilase) em plantas de soja sob condição de estresse osmótico (PEG), verificando que após 20 h o tratamento com PEG não havia afetado a atividade de GAD ou os níveis de Gaba em nenhum tecido da planta. De acordo com esses mesmos autores, a não correlação entre o acúmulo de Gaba e estresse osmótico poderia estar associada ao abrupto tratamento com PEG, uma vez que a análise da seiva do xilema de plantas de soja sob déficit hídrico indicou expressivo aumento (cerca de 230%) desse aminoácido em relação às plantas irrigadas.

### ***Em plantas jovens de café***

Em plantas de café sob condições normais de irrigação os aminoácidos asparagina (Asn) e glutamato (Glu) representaram cerca de 50% do total de aminoácidos livres nas raízes (tabela 6) e nas folhas (tabela 7). Sob déficit hídrico, esse perfil foi alterado e substanciais aumentos nos aminoácidos Asn e Gaba nas raízes e folhas dos cafeeiros em relação ao controle irrigado foram observados (tabelas 6 e 7).

Entre as cultivares de café arábica, Catuaí Vermelho mostrou 100% de aumento no conteúdo de Asn na raiz, enquanto em Mundo Novo, o Gaba foi elevado em cerca de 2,6 vezes o valor obtido para as raízes de plantas irrigadas. As raízes de Apoatã exibiram aumento de cerca de 1,9 vezes o valor obtido no controle para ambos os aminoácidos Asn e Gaba. Já nas

plantas enxertadas sob estresse, apenas um acúmulo de Asn (1,4 vezes) foi detectado (tabela 6). O teor de Asn também aumentou nas folhas de cafeeiros arábica sob estresse hídrico, sendo 4,6 vezes maior em Catuaí Vermelho e 1,6 vezes em Mundo Novo em relação aos respectivos controles irrigados (tabela 7). Nas folhas das plantas enxertadas foi observado uma redução de cerca de 2,7 vezes no conteúdo de Asn, enquanto Apoatã não mostrou diferença entre os tratamentos. O acúmulo de Gaba nas folhas dos cafeeiros sob estresse foi menos significativo do que o observado nas raízes (tabela 6), sendo 76,9% de aumento em Mundo Novo, 50,6% em MN/Apoatã e apenas 14,6% na cv. Apoatã (tabela 7).

Tabela 6. Análise qualitativa de aminoácidos por HPLC em raízes de café. Os valores expressos em mol% indicam uma estimativa média da massa de cada aminoácido e seu respectivo desvio padrão em amostras de raiz de café (n = 3).

Massa AA (mol%) - RAIZ								
Genótipo AA	Catuaí Verm.		M. Novo		Apoatã		MN/Apoatã	
	irrig.	seca	irrig.	seca	irrig.	seca	irrig.	seca
Asp	4,43±0,36	4,44±0,65	6,55±1,34	5,65±0,13	8,00±0,72	7,06±1,25	7,95±2,41	8,47±2,03
Glu	20,93±4,66	8,41±0,25	20,39±1,81	9,14±1,53	24,73±1,48	10,74±0,98	17,92±1,67	14,57±1,66
Asn	25,13±0,21	51,63±5,07	32,54±1,37	33,35±0,80	16,07±2,02	30,37±2,30	20,85±3,63	29,17±2,95
Ser	9,86±0,98	8,12±0,80	10,91±1,31	9,14±0,67	12,83±1,59	12,57±2,09	12,00±0,60	12,73±0,51
Gln+His*	3,24±0,40	3,54±0,35	2,62±0,32	2,50±0,22	2,12±0,33	2,79±0,24	2,63±0,59	2,59±0,07
Gly+Thr*	1,81±0,92	1,49±0,29	2,24±0,46	1,86±0,19	3,18±0,38	1,35±0,07	2,91±0,85	1,06±0,25
Arg	2,24±0,23	2,96±0,19	2,17±0,08	3,04±0,45	2,20±0,24	2,87±0,35	1,88±0,13	2,94±0,17
Ala	8,02±1,19	3,49±0,48	10,35±3,67	6,08±0,22	7,92±2,09	6,13±0,73	6,40±1,13	5,83±0,07
Tyr	0,31±0,04	0,43±0,14	0,27±0,07	0,24±0,30	0,33±0,12	0,70±0,12	0,22±0,11	0,38±0,04
Met	1,16±0,52	1,99±0,43	1,27±0,25	1,52±0,83	0,63±0,03	1,23±0,28	1,01±0,18	2,23±0,44
Val+Phe	2,65±0,66	1,21±0,08	2,33±0,13	1,62±0,08	5,87±0,70	5,08±1,00	4,15±0,34	4,10±0,89
Ile	2,33±0,61	2,22±0,32	3,34±0,71	3,49±0,48	2,70±0,43	3,54±0,68	2,42±0,74	2,28±0,50
Leu	0,64±0,08	0,66±0,13	0,58±0,12	0,99±0,27	0,49±0,08	1,38±0,38	0,46±0,05	1,04±0,58
Lys	0,89±0,37	0,62±0,08	0,99±0,21	1,32±0,11	0,73±0,10	1,13±0,30	0,80±0,11	1,19±0,33
Gaba	7,97±0,84	9,05±1,69	7,92±0,07	20,52±2,23	7,52±0,49	14,37±0,83	7,72±1,12	11,42±0,40

(\*) picos não individualizados pelo método.

O acúmulo de Asn em plantas de café sob déficit hídrico foi consistente com dados obtidos para outras espécies de plantas sob diversos estresses ambientais, verificado pelo aumento na expressão do gene da aspargina sintetase, sendo AS em milho (Chevalier *et al.*,

1996), *ASN2* em *A. thaliana* (Wong *et al.*, 2004), *TaASN1* em trigo (Wang *et al.*, 2005) e *HAS1* e *HAS1.1* em girassol (Herrera-Rodríguez *et al.*, 2007).

Tabela 7. Análise qualitativa de aminoácidos por HPLC em folhas de café. Os valores expressos em mol% indicam uma estimativa média da massa de cada aminoácido e seu respectivo desvio padrão em amostras de folha de café (n = 3).

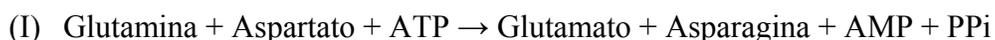
AA	Genótipo	Massa de AA (mol%) - FOLHA							
		Catuaí Verm.		M. Novo		Apoatã		MN/Apoatã	
		irrig.	seca	irrig.	seca	irrig.	seca	irrig.	seca
Asp		6,22±1,16	1,88±0,10	3,62±1,20	2,81±0,32	8,38±0,18	1,81±0,14	7,85±0,07	4,02±1,20
Glu		36,69±5,97	9,67±3,16	23,67±1,91	15,65±3,25	31,91±1,11	31,87±5,42	27,10±0,54	31,28±3,74
Asn		13,14±2,04	60,85±8,33	28,07±5,35	44,91±3,67	15,48±3,88	15,23±3,60	30,48±1,80	11,20±8,84
Ser		10,45±0,38	2,83±0,27	5,37±2,65	5,71±1,32	10,55±1,22	7,94±1,33	7,44±0,85	9,13±1,25
Gln+His*		4,51±0,60	3,63±0,23	7,09±1,36	8,35±2,96	5,01±1,51	5,08±1,29	7,53±1,03	4,74±0,52
Gly+Thr*		1,37±0,20	2,48±0,41	3,95±0,59	1,98±0,23	1,91±0,40	1,38±0,28	1,54±0,42	1,96±0,71
Arg		4,10±0,36	2,03±0,51	3,42±0,68	4,64±0,60	2,43±0,39	4,50±0,53	3,43±0,25	4,43±1,09
Ala		4,36±0,21	0,76±0,08	5,25±1,45	3,62±0,09	5,62±1,17	3,71±0,51	3,97±1,71	6,14±0,90
Tyr		0,46±0,11	0,39±0,01	1,24±0,12	1,28±0,32	0,26±0,03	1,41±0,28	0,31±0,05	0,94±0,20
Met		0,54±0,03	0,41±0,03	1,49±0,13	1,34±0,26	2,21±0,49	3,19±0,05	1,62±0,07	1,35±0,34
Val+Phe*		6,44±0,19	1,79±0,29	5,09±0,29	3,66±0,95	3,59±0,16	9,61±0,89	4,47±0,21	11,28±1,19
Ile		3,52±0,38	0,98±0,02	2,99±0,67	3,12±0,01	3,00±0,27	4,45±0,98	3,98±0,10	3,80±1,03
Leu		0,49±0,17	0,32±0,09	2,33±1,12	2,15±0,24	0,21±0,15	2,37±0,23	0,34±0,17	1,12±0,23
Lys		1,35±0,83	0,92±0,25	3,26±0,07	1,94±0,53	0,39±0,07	2,01±0,12	0,40±0,07	1,60±0,45
Gaba		2,83±0,68	1,25±0,23	2,04±0,94	3,61±0,79	6,51±0,79	7,46±0,20	2,47±0,55	3,72±0,35

(\*) picos não individualizados pelo método.

Chevalier *et al.* (1996) sugeriram que mudanças na expressão do gene *AS* em resposta ao estresse poderia ter sido mediada por alterações no balanço intracelular de carbono/nitrogênio (C/N). Por outro lado, estudo de expressão dos genes *HAS1* e *HAS1.1* em girassol verificou acúmulo de transcritos induzido por estresse osmótico, salino e por metal pesado, nas raízes (predominantemente) e nas folhas (Herrera-Rodríguez *et al.*, 2007). Contudo, os autores não foram capazes de estabelecer uma correlação positiva entre os níveis de expressão desses genes e as alterações no balanço C/N sob tais condições de estresse, considerando que altas razões C/N deveriam reprimir a expressão de asparagina sintetase, enquanto baixas proporções C/N promoveriam sua indução (Herrera-Rodríguez *et al.*, 2004).

Em concordância com Chevalier *et al.* (1996), os resultados obtidos em café indicam que os elevados conteúdos de Asn poderiam estar correlacionados com as expressivas reduções no balanço C/N em plantas sob déficit hídrico, estimado com base nos teores de sacarose (C) e aminoácidos livres totais (N) mensurados nas raízes e folhas dos cafeeiros. As alterações verificadas na relação C/N nos genótipos de café sugerem alta atividade de degradação de proteínas e concomitante acúmulo de íons amônio decorrentes da redução da fotossíntese sob condição de estresse hídrico. Nesse sentido, a síntese aumentada de Asn poderia relacionar-se à manutenção do estoque de nitrogênio evitando os efeitos tóxicos do amônio (assimilado para produzir Asn) ou ainda atuar como soluto compatível no ajuste osmótico em café.

O acúmulo nos teores de Gaba induzido pelo estresse hídrico, principalmente nas raízes do café, parece estar associado à rota de síntese da Asn, que pode ocorrer por duas vias distintas: transaminação da glutamina (I) ou pela adição direta da amônia ao aspartato (II) (Taiz & Zeiger, 2004):



Sob estresse hídrico, o acúmulo de Asn favorece também o aumento no teor de glutamato (I), que por sua vez atua como aminoácido precursor de Gaba via atividade da enzima glutamato descarboxilase (GAD), elevando seu teor nos tecidos da planta. Com efeito, foram verificadas importantes reduções nos teores de glutamato (Glu) e alanina (Ala) nas raízes de cafeeiros sob estresse, principalmente nas cultivares de café arábica, com quedas de 59,8% (Glu) e 56,5% (Ala) em Catuaí Vermelho e 55,2% (Glu) e 41,3% (Ala) em Mundo Novo. Nas folhas, as reduções atingiram 73,6% (Glu) e 82,6% (Ala) em Catuaí Vermelho, 33,9% (Glu) e 31,0% (Ala) em Mundo Novo. Também se observou redução no teor de aspartato (Asp) nas folhas, sendo 69,7% em Catuaí Vermelho, 22,4% em Mundo Novo, 78,4%

em Apoatã e 48,8% em MN/Apoatã, em relação às plantas irrigadas.

Em conclusão, sugere-se que as principais mudanças observadas nos teores dos aminoácidos e açúcares nas plantas de café estejam fortemente relacionadas à manutenção do balanço C/N sob déficit hídrico, promovendo a assimilação/estoque de N e/ou a detoxificação do amônio acumulado, podendo, paralelamente, desempenhar uma função osmoprotetora atuando no ajuste osmótico nas células sob baixo potencial hídrico.

## 5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos *in vitro* para as suspensões de café é possível afirmar que a expressão do gene *CaDh1* foi afetada pela redução do potencial hídrico no meio de cultura devido ao estresse osmótico, reforçando o envolvimento das deidrinases em mecanismos de defesa contra a dessecação. Aparentemente, as aquaporinas *PIP1*, *PIP2* e *TIP1* não apresentaram resposta diferencial ao estresse em suspensão celular de café e, nesse sentido, fatores como luz, tempo de tratamento e severidade do estresse osmótico imposto à cultura poderiam explicar tal comportamento. Em paralelo, verificou-se que os teores de solutos orgânicos como açúcares e aminoácidos não foram alterados significativamente ao longo de 72 h nas células de café sob estresse osmótico em relação aos tratamentos controles. Tal constatação indica que as células de café parecem não empregar o ajuste osmótico via acúmulo dos solutos compatíveis analisados ou, pelo menos, não emprega essa estratégia nos etapas iniciais do estresse hídrico, ao contrário, a expressão de genes como as deidrinases exibiram resposta precoce ao estresse.

O estudo com plantas de café sob estresse hídrico revelou, sob aspectos morfológicos e fisiológicos, algumas diferentes estratégias utilizadas pelos genótipos analisados. Desse modo, as cultivares de café arábica demonstraram maior sensibilidade ao déficit hídrico, pois exibiram perdas maiores de biomassa (parte aérea e raízes) que as plantas de café robusta e enxertadas, fato este atribuído à menor eficiência na captação de água do solo devido a características intrínsecas de seus sistemas radiculares. Essa hipótese foi validada pelos dados obtidos em plantas enxertadas, para as quais menores taxas de redução no  $\Psi_w$  em relação às plantas Mundo Novo não enxertadas, resultaram em melhor desempenho (ganho de biomassa na parte aérea) daquelas sob condição de estresse hídrico, reforçando uma correlação positiva entre maiores valores de  $\Psi_w$  e tolerância à seca em genótipos de café.

A análise dos teores de compostos orgânicos nos cafeeiros submetidos ao estresse hídrico evidenciou acúmulos expressivos no conteúdo de aminoácidos totais (folha), principalmente entre as cultivares de café arábica, e também no conteúdo de prolina, acumulado fortemente em todos os genótipos. A elevada presença de prolina nos tecidos de plantas submetidas à seca poderia indicar um provável papel no ajuste osmótico das células sob estresse osmótico ou uma resposta à injúria provocada pelo estresse, possuindo assim uma função secundária como mecanismo de tolerância à seca em café. Outros aminoácidos como asparagina e Gaba, também foram acumulados sob estresse, provavelmente para favorecer a manutenção do estoque de nitrogênio nas células, evitando os efeitos nocivos do amônio resultante da maior degradação de proteínas.

A análise de possíveis estratégias para tolerar a baixa disponibilidade de água no solo mostrou variações entre as duas espécies de café estudadas, entretanto, possuem relação parcial com características específicas de seus sistemas radiculares. Assim, a tolerância em café robusta parece estar fortemente associada à presença de um sistema radicular mais vigoroso (e profundo), capaz de sustentar a demanda hídrica das plantas por um maior período de tempo durante a seca. Entre as cultivares de café arábica, Catuaí Vermelho tendeu a exibir melhores taxas de crescimento vegetativo (biomassa total) em relação à Mundo Novo, o que poderia, em parte, estar associado à maior superfície de raiz observada em Catuaí.

Em suma, no caso de plantas cultivadas, é preciso ainda ter em consideração a real correspondência entre produtividade e tolerância à seca, principalmente quando prováveis estratégias de tolerância são tomadas como critério na seleção de novas cultivares. Nesse sentido, a utilização da enxertia aparece como uma alternativa eficiente e viável, capaz de aliar caracteres desejáveis da copa e do porta-enxerto, possibilitando um maior potencial de produção para a cultura, conforme observado em café.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alègre, C., 1959. Climates et caféiers d' Arabie. Agron. Trop., 14:23-58.
- Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Feller, M., Karlsson, M., Johanson, U. & Kjellbom, P., 2005. Whole gene family expression and drought regulation of aquaporins. Plant Mol. Biol., 59:469-484.
- Alfonsi, E.L., Fahl, J.I., Carelli, M.L.C. & Fazuoli, L.C., 2005. Crescimento, fotossíntese e composição mineral em genótipos de *Coffea* com potencial para utilização como porta-enxerto. Bragantia, 64:1-13.
- Al-Khayri, J.M. & Al-Bahrany, A.M., 2004. Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. Biol. Plant., 48:105-108.
- Allagulova, C.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M. & Vakhitov, V.A., 2003. The plant dehydrins: structure and putative functions. Biochemistry (Moscow), 68:945-951.
- Baker, J., Steele, C. & Dure. L. III, 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. Plant Mol. Biol., 11:277-291.
- Barrieu, F., Marty-Mazars, D., Thomas, D., Chaumont, F., Charbonnier, M. & Marty, F., 1999. Dessication and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells. Planta, 209:77-86.
- Barros, R.S., Mota, J.W., DaMatta, F.M. & Maestri, M., 1997. Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potencial and stomatal conductance. Field Crops Res., 54:65-72.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil, 39:205-207.
- Blum, A., 1996. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. Plant Growth Regul., 20:135-148.
- Blum, A., Mayer, J. & Gozlan, G., 1983. Associations between plant production and some physiological components of drought resistance in wheat. Plant Cell Environ., 6:219-225.
- Bray, E.A., 1993. Molecular responses to water deficit. Plant Physiol., 103:1035-1040.
- Camargo, A.P., 1985. O clima e a cafeicultura no Brasil. Informe Agropecuário, 11:13-26.
- Carr, M.K.V., 2001. The water relations and irrigation requirements of coffee. Exp. Agric., 37: 1-36.
- Carvalho, A., Filho, H.P.M. & Fazuoli, L.C., 1985. Colóquio Internacional de Citogenética de Plantas, Piracicaba, p.215-234.

- Cellier, F., Conéjéro, G., Breitler, J.C. & Casse, F., 1998. Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. *Plant Physiol.*, 116:319-328.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R. & Chrispeels, M.J., 2000. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.*, 122:1025-1034.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik E., Chrispeels, M.J. & Jung, R., 2001. Aquaporins constitutes a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.*, 125:1206-1215.
- Chaumont, F., Moshelion, M., & Daniels, M.J., 2005. Regulation of plant aquaporin activity. *Biol. Cell*, 97:749-764.
- Chen, T.H.H. & Murata, N., 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5:250-257.
- Chen, T.H.H. & Murata, N., 2008. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends Plant Sci.*, 13:499-505.
- Chevalier, C., Bourgeois, E., Just, D. & Raymond, P., 1996. Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant J.*, 9:1-11.
- Choi, D.W., Zhu, B. & Close, T.J., 1999. The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv. Dicktoo. *Theor. Appl. Genet.*, 98:1234-1247.
- Close, T.J., 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.*, 97:795-803.
- Close, T.J., 1997. Dehydrins: a commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.*, 100:291-296.
- Cocking, E.C. & Yemm, E.W., 1954. Estimation of aminoacids by ninhidrin. *Biochem. J.*, 58:12-13.
- Coste, R., 1992. Coffee: The plant and the product, Mac Millan, London, 328p.
- DaMatta, F.M. & Ramalho, J.D.C., 2006. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18:55-81.
- DaMatta, F.M. & Rena, A.B., 2001. Tolerância do café à seca. IN: Zambolin L. (ed), *Tecnologias de Produção de Café com Qualidade*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 65-100.
- DaMatta, F.M., Maestri, M., Barros, R.S. & Regazzi, A.J., 1993. Water relations of coffee leaves (*Coffea arabica* and *C. canephora*) in response to drought. *J. Hort. Sci.*, 68:741-746.

- DaMatta, F.M., Maestri, M. & Barros, R.S., 1997. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica*, 34:257-264.
- DaMatta, F.M., Silveira, J.S.M., Ducatti, C. & Loureiro, M.E., 2000. Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. IN: Resumo expandido para o I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Embrapa Café, Brasília, pp. 907-910.
- DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Pinheiro, H.A., Ducatti, C. & Loureiro, M.E., 2003. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Sci.*, 164:111-117.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., & Sarhan, F., 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10:623-638.
- Dias, P.C., Araujo, W.L., Moraes, G.A.B.K., Barros, R.S. & DaMatta, F.M., 2007. Morphological and physiological responses of two coffee progenies to soil water availability. *J. Plant Physiol.*, 164:1639-1647.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356.
- Dure, L. III, 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.*, 3:363-369.
- Dure, L. III, Crouch, M., Harada, J., Ho, T.H.D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T. & Sung, Z.R., 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 12:475-486.
- Egerton-Warburton, L.M., Balsamo, R.A. & Close, T.J., 1997. Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays*. *Physiol. Plant.*, 101:545-555.
- Fahl, J.I. & Carelli, M.L.C., 1985. Estudo fisiológico da interação enxerto e porta-enxerto em planta de café. IN: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu, Brasil, Anais, p.115-117.
- Fahl, J.L., Carelli, M.L.C., Costa, W.M. & Novo, M.C.S.S., 1998. Enxertia de *Coffea arabica* sobre progênies de *C. canephora* e de *C. congensis* no crescimento, nutrição mineral e produção. *Bragantia*, 57:297-312.
- Fahl, J.I., Carelli, M.L.C., Menezes, H.C., Gallo, P.B. & Trivelin, P.C.O., 2001a. Gas exchange, growth, yield and beverage quality of *Coffea arabica* cultivars grafted on to *C. canephora* and *C. congensis*. *Exp. Agric.*, 37:241-252.
- Fahl, J.I., Carelli, M.L.C., Magossi, R., Alfonsi, E.L. & Pezzopane, J.R.M., 2001b. Estudo da enxertia de cultivares de *Coffea arabica* sobre *C. canephora* nas características fotossintéticas e de fluxo de seiva. IN: II Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Vitória, Brasil, Anais.

- Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A. & Yeo, A.R., 1991. Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oerthi hypothesis. *Plant Cell Environ.*, 14:319-325.
- Fujiyoshi, Y., Mitsuoka, K., Groot, B.L., Philippsen, A., Grubmüller, H., Agre, P. & Engel, A., 2002. Structure and function of water channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12:509-515.
- Garay-Arroyo, A., Colmenoro-Florest, J.M., Garcarrubio, A. & Covarrubias, A.A., 2000. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eucaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem.*, 275:5668-5674.
- Gaspar, M., Bousser, A., Sissoëff, I., Roche, O., Hoarau, J. & Mahé, A., 2003. Cloning and characterization of *ZmPIP1-5b*, an aquaporin transporting water and urea. *Plant Sci.*, 165:21-31.
- Genshik, P., Parmentier, Y., Durr, A., Marbach, J., Criqui, M.C., Jamet, E. & Fleck, J., 1992. Ubiquitin genes are differentially regulated in protoplast-derived cultures of *Nicotiana sylvestris* and in response to various stresses. *Plant Mol. Biol.*, 20:897-910.
- Hachez, C., Moshelion, M., Zelazny, E., Cavez, D. & Chaumont, F., 2006. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol. Biol.*, 62:305-323.
- Handel, E.V., 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.*, 22:280-283.
- Henzler, T., Waterhouse, R.N., Smyth, A.J., Carvajal, M., Cooke, D.T., Schäffner, A.R., Steudle, E. & Clarkson, D.T., 1999. Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus japonicus*. *Planta*, 210:50-60.
- Herrera-Rodríguez, M.B., Maldonado, J-M. & Pérez-Vicente, R., 2004. Light and metabolic regulation of *HAS1*, *HAS1.1* and *HAS2*, three asparagine synthetase genes in *Helianthus annuus*. *Plant Physiol. Biochem.*, 42:511-518.
- Herrera-Rodríguez, M.B., Pérez-Vicente, R. & Maldonado, J-M., 2007. Expression of asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) under various environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.*, 45:33-38.
- Heymann, J.B. & Engel, A., 1999. Aquaporins: phylogeny, structure, and physiology of water channels. *News Physiol. Sci.*, 14:187-193.
- Hinniger, C., Caillet, V., Michoux, F., Ben-Amor, M., Tanksley, S., Lin, C. & Mccarthy, J., 2006. Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (robusta) grain development. *Ann. Bot.*, 97:755-765.
- Hopkins, W.G., 1999. The physiology of plants under stress. IN: Introduction to Plant Physiology, 2nd Edition, John Wiley & Sons. Inc., pp.451-475.

- Ingram, J. & Bartels, D., 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:377-403.
- Jang, J.Y., Kim, D.G., Kim, Y.O., Kim, J.S. & Kang, H., 2004. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 54:713-725.
- Jang, J.Y., Rhee, J.Y., Kim, D.G., Chung, G.C., Lee, J.H. & Kang, H., 2007. Ectopic expression of a foreign aquaporin disrupts the natural expression patterns of endogenous aquaporin genes and alters plant responses to different stress conditions. *Plant Cell Physiol.*, 48:1331-1339.
- Jarret, H.W., Coosky, K.D., Ellis, B. & Anderson, J.M., 1986. The separation of *o*-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica column. *Anal. Biochem.*, 153:189-198.
- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-Laurent, F., Güçlü, J., Vinh, J., Heyes, J., Franck, K.I., Schäffner, A.R., Bouchez, D. & Maurel, C., 2003. Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell*, 15:509-522.
- Johnson K.D., Höfte H. & Chrispeels M.J., 1990. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF). *Plant Cell*, 2:525-532.
- Johanson, U., Karlsson, M., Gustavsson, S., Sjoval, S., Fraysse, L., Weig, A.R. & Kjellbom, P., 2001. The complete set of genes encoding Major Intrinsic Proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for Major Intrinsic Proteins in plants. *Plant Physiol.*, 126:1358-1369.
- Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V.K., Chrispeels, M.J., Larsson, C. & Kjellbom, P., 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 10:451-459.
- Johansson, I., Karlsson, M., Larsson, C. & Kjellbom, P., 2000. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochem. Biophys. Acta*, 1465:324-342.
- Kammerloher, W., Fischer, U., Piechottka, G.P. & Schäffner A.R., 1994. Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J.*, 6:187-199.
- Khurana, P., Vishnudasana, D. & Chhibbar, A.K., 2008. Genetic approaches towards overcoming water deficit in plants - special emphasis on LEAs. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 14:277-298.
- Koag, M.C., Fenton, R.D., Wilkens, S. & Close, T.J., 2003. The binding of maize DHN1 to lipid vesicles: gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol.*, 131:309-316.

- Kobae, Y., Mizutani, M., Segami, S. & Maeshima, M., 2006. Immunochemical analysis of aquaporin isoforms in *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70:980-987.
- Kramer, P.J. & Boyer, J., 1995. *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego, 495p.
- Larcher, W., 2003. Water Relations. IN: *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*, 3rd Edition, Springer, pp.231-297.
- Lea, P.J., Sodek, L., Parry, M.A.J., Shewry, P.R. & Halford, N.G., 2007. Asparagine in plants. *Ann. Appl. Biol.*, 150:1-26.
- Levin, M., Resnick, N., Rosianskey, Y., Kolotilin, I., Wininger, S., Lemcoff, J.H., Cohen, S., Galili, G., Koltai, H. & Kapulnik, Y., 2009. Transcriptional profiling of *Arabidopsis thaliana* plants' response to low relative humidity suggests a shoot-root communication, *Plant Sci.*, doi:10.1016/j.plantsci.2009.07.010
- Li, L.G., Li, S.F., Tao, Y. & Kitagawa, Y., 2000. Molecular cloning of a novel water channel from rice: its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. *Plant Sci.*, 154:43-51.
- Lian, H.L., Yu, X., Ye, Q., Ding, X.S., Kitagawa, Y., Kwak, S.S., Su, W.A. & Tang, Z.C., 2004. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant Cell Physiol.*, 45:481-489.
- Lima, A.L., DaMatta, F.M., Pinheiro, H.A., Totola, M.R. & Loureiro, M.E., 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 47:239-247.
- Lin, C., Mueller, L.A., Mc Carthy, J., Crouzillat, D., Pétiard, V. & Tanksley, S.D., 2005. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theor. Appl. Genet.*, 112:114-130.
- Liu, Q., Umeda, M. & Uchimiya, H., 1994. Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Mol. Biol.*, 26:2003-2007.
- Lopez, C.G., Banowetz, G.M., Peterson, C.J. & Kronstad, W.E., 2003. Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Sci.*, 43:577-582.
- Lopez, F., Bousser, A., Sissoëff, I., Gaspar, M., Lachaise, B., Hoarau, J. & Mahé, A., 2003. Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant Cell Physiol.*, 44:1384-1395.
- Lopez, F., Bousser, A., Sissoëff, I., Hoarau, J. & Mahé, A., 2004. Characterization in maize of ZmTIP2-3, a root-specific tonoplast intrinsic protein exhibiting aquaporin activity. *J. Exp. Bot.*, 55: 539-541.

- Ludlow, M.M., Santamaria, J.M. & Fukai, S., 1990. Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Sorghum bicolor* (L.) Moench under water-limited conditions. II. Water stress after anthesis. *Aust. J. Agric. Res.*, 41:67-78.
- Luu, D.T. & Maurel, C., 2005. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ.*, 28:85-96.
- Maestri, M., DaMatta, F.M., Regazzi, A.J. & Barros, R.S., 1995. Accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in mature leaves of water stressed coffee plants (*Coffea arabica* and *C. canephora*). *J. Hort. Sci.*, 70:229-233.
- Mahdieh, M., Mostajeran, A., Horie, T. & Katsuhara, M., 2008. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiol.*, 49:801-813.
- Mariaux, J.B., Bockel, C., Salamini, F. & Bartels, D., 1998. Desiccation and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.*, 38:1089-1099.
- Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G.B., Nobel, P.S. & Chrispeels, M.J., 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.*, 130:2101-2110.
- Maurel, C., 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:399-429.
- Maurel, C. & Chrispeels, M.J., 2001. Aquaporins – a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.*, 125:135-138.
- Maurel, C., Chrispeels, M.J., Lurin, C., Tacnet, F., Geelen, D., Ripoche, P. & Guern, J., 1997. Function and regulation of seed aquaporins. *J. Exp. Bot.*, 48:421-430.
- Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V. & Heyes, J., 2002. Molecular physiology of aquaporins in plants. *Int. Rev. Cytol.*, 215:105-148.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. & Santoni, V., 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59:595-624.
- Mazzafera, P. & Carvalho, A., 1987. Produção e tolerância à seca de cafeeiros. *Bragantia*, 46:403-415.
- Mazzafera, P. & Teixeira, J.P.F., 1989. Prolina em cafeeiros submetidos a déficit hídrico. *Turrialba*, 39:305-313.
- Meinzer, F.C., Grantz, D.A., Goldstein, G. & Saliendra, N.Z., 1990. Leaf water relations and maintenance of gas exchange in coffee cultivars grown in drying soil. *Plant Physiol.*, 94:1781-1787.

- Meneses, C.H.S.G., Lima, L.H.G.M., Lima, M.M.A. & Vidal, M.S., 2006. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. *Rev. bras. ol. fibros.*, 10:1039-1072.
- Menezes, G.R.O., 2005. Estresse oxidativo mediado por paraquat e clonagem do gene da dismutase do superóxido (Cu/Zn- SOD) em *Coffea canephora*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, tese de mestrado.
- Mizutani, M. Watanabe, S., Nakagawa, T. & Maeshima, M., 2006. Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 47: 1420-1426.
- Mitra, J., 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Curr. Sci.*, 80:758-763.
- Moinuddin, R.A, Fischer, K.D.S. & Reynolds, M.P., 2005. Osmotic adjustment in wheat in relation to grain yield under water deficit environments. *Agron. J.*, 97:1062-1071.
- Montagnon, C., Leroy, T. & Eskes, A.B., 1998. Amélioration variétale de *Coffea canephora*. I. Critères et méthodes de sélection. *Plantation, recherche, développement.*, 5:18-33.
- Moshelion, M., Becker, D., Biela, A., Uehlein, N., Hedrich, R., Otto, B., Levi, H., Moran, N. & Kaldenhoff, R., 2002. Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell*, 14:727-739.
- Moraes, M.V. & Franco, C.M., 1973. Método expedito para enxertia em café. *Boletim do Instituto Brasileiro de Café*, 8p.
- Morgan, J.M., 1983. Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 34:607-614.
- Morgan, J.M., 1995. Growth and yield of wheat lines with differing osmoregulative capacity at high soil water deficit in seasons of varying evaporative demand. *Field Crops Res.*, 40:143-152.
- Morgan, J.M. & Condon, A.G., 1986. Water use, grain yield, and osmoregulation in wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 13:523-532.
- Neuenschwander B. & Baumann, T.W., 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.*, 10:608-612.
- Nunes, M.A., 1976. Water relations in coffee: significance of plant water deficits to growth and yield: a review. *J. Coffee Res.*, 6:4-21.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T. & Welin, B.V., 2001. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 45:263-279.

- Parra, M.M., Del Pozo, O., Luna, R., Godoy, J.A. & Pintor-Toro, J.A., 1996. Structure of the dehydrin *tas14* gene of tomato and its developmental and environmental regulation in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 32:453-460.
- Passioura, J.B., 1996. Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regul.*, 20:79-83.
- Passioura, J. B., 1997. Drought and drought tolerance. IN: Belhassen, I. (Ed.). *Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological, and molecular biological analysis*. Dordrecht, Kluwer Academic, pp.1-7.
- Pérez, L.R., 2006. Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agron. Colomb.*, 24:28-37.
- Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B. & Loureiro, M.E., 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Sci.*, 167:1307-1314.
- Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Loureiro, M.E. & Ducatti, C., 2005. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. *Ann. Bot.*, 96:101-108.
- Praxedes, S.C., DaMatta, F.M., Loureiro, M.E., Ferrão, M.A.G. & Cordeiro, A.T., 2006. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environ. Exp. Bot.*, 56:263-273.
- Rabe, E., 1990. Stress physiology: the functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. *J. Hort. Sci.*, 65: 231-243.
- Ramos, L.C.S. & Lima, M.M.A., 1980. Avaliação da superfície relativa do sistema radicular de cafeeiros. *Bragantia*, 39:1-5.
- Ramos, R.L.S. & Carvalho, A., 1997. Shoot and root evaluations on seedlings from *Coffea* genotypes. *Bragantia*, 56:59-68.
- Rena, A.B., Barros, R.S., Maestri, M., Söndahl, M.R., 1994. Coffee. IN: Schaffer B, Andersen PC (eds), *Handbook of Environmental Physiology of Tropical Fruit Crops: Sub-Tropical and Tropical Crops*, Vol. II, p.101-122. CRC Press, Boca Raton.
- Rezende, A.M. & Rosado, P.L., 2004. A informação no mercado de café. In: Zambolim L, editor. *Produção integrada de café*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp. 1-46.
- Richards, R.A., 1997. Defining selection criteria to improve yield under drought. IN: Belhassen E (ed), *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp.79-88.

- Rodríguez-Maribona, B., Tenorio, J.L., Conde, J.R. & Ayerbe, L., 1992. Correlation between yield and osmotic adjustment of peas (*Pisum sativum* L.) under drought stress. *Field Crops Res.*, 29:15-22.
- Rodríguez, E.M., Svensson, J.T., Malatrasi, M., Choi, D.W. & Close, T.J., 2005. Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theor. Appl. Genet.*, 110:852-858.
- Ronchi, C.P., DaMatta, F.M., Batista, K.D., Moraes, G.A.B.K., Loureiro, M.E. & Ducatti, C., 2006. Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricted root volume. *Funct. Plant Biol.*, 33:1013-1023.
- Rorat, T., 2006. Plant dehydrins – tissue location, structure and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 11:536-556.
- Rorat, T., Grygorowicz, W.J., Irzykowski, W. & Rey, P., 2004. Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta*, 218:878-885.
- Rorat, T., Szabala, B.M., Grygorowicz, W.J., Wojtowicz, B., Yin, Z. & Rey, P., 2006. Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta*, 224:205-221.
- Saes, M.S.M. & Nakazone, D., 2004. O agronegócio café do Brasil no mercado internacional. *Rev. Fae Business*, 9:40-42.
- Sarda, X., Tusch, D., Ferrare, K., Legrand, E., Dupuis, J.M., Casse-Delbart, F. & Lamaze, T., 1997. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant J.*, 12:1103-1111.
- Sarda, X., Tusch, D., Ferrare, K., Cellier, F., Alcon, C., Dupuis, J.M., Casse, F. & Lamaze, T., 1999. Characterization of closely related delta-TIP genes encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. *Plant Mol. Biol.*, 40:179-191.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M. & Wisman, E., 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13:113-123.
- Schäffner, A.R., 1998. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta*, 204:131-139.
- Serraj, R. & Sinclair, T.R., 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.*, 25:338-341.
- Serraj, R., Shelp, B.J. & Sinclair, T.R., 1998. Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress. *Physiol. Plant.*, 102:79-86.

- Shelp, B.J., Bown, A.W. McLean, M.D., 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.*, 4:446-452.
- Siefritz, F., Tyree, M.T., Lovisolo, C., Schubert, A. & Kaldenhoff, R., 2002. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell*, 14:869-876.
- Silva, V.A., 2007. Caracterização fisiológica da tolerância à seca em *Coffea canephora*: contribuição relativa do sistema radicular e da parte aérea. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. Brasil. Tese de doutorado.
- Silva, E.A. & Mazzafera, P., 2008. Influences of temperature and water in the coffee culture. *Am. J. Plant Sci. Biotechnol.*, 2:32-41.
- Smart, L.B., Moskal, W.A., Cameron, K.D. & Bennett, A.B., 2001. *MIP* genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiol.*, 42:686-693.
- Subbarao, G.V., Chauhan, Y.S. & Johansen, C., 2000. Patterns of osmotic adjustment in pigeonpea – its importance as a mechanism of drought resistance. *Eur. J. Agron.*, 12:239-249.
- Suga, S., Komatsu, S. & Maeshima, M., 2002. Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 43:1229-1237.
- Suga, S., Murai, M., Kuwagata, T. & Maeshima, M., 2003. Differences in aquaporin levels among cell types of radish and measurement of osmotic water permeability of individual protoplasts. *Plant Cell Physiol.*, 44:277-286.
- Tabaei-Aghdaei, S.R., Harrison, P. & Pearce, R.S., 2000. Expression of dehydration-stress-related genes in the crowns of wheatgrass species [*Lophopyrum elongatum* (Host) A. Love and *Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link.) Schult.] having contrasting acclimation to salt, cold and drought. *Plant Cell Environ.*, 23:561-571.
- Taiz, L. & Zeiger, E., 2004. A água e as células vegetais. IN: *Fisiologia Vegetal*, 3ª Ed., Artmed, Porto Alegre, pp.61-74.
- Trans, L.S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K., 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress inducible NAC transcription factors that bind to drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16: 2481-2491.
- Turner, N.C., 1997. Further progress in crop water relations. *Adv. Agron.*, 58:293-338.
- Tyerman, S.D., Niemietz, C.M. & Bramley, H., 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell Environ.*, 25:173-194.
- Vieira, L.G.E., Andrade, A.C., Colombo, C.A., Moraes, A.H.A., Metha, Â., Oliveira, A.C., Labate, C.A., Marino, C.L., Monteiro-Vitorello, C.B., Monte, D.C., Giglioti, E., Kimura, E.T., Romano, E., Kuramae, E.E., Lemos, E.G.M., Almeida, E.R.P., Jorge, E.C.,

- Albuquerque, E.V.S., Silva, F.R., Vinecky, F., Sawazaki, H.E., Dorry, H.F.A., Carrer, H., Abreu, I.N., Batista, J.A.N., Teixeira, J.B., Kitajima, J.P., Xavier, K.G., Lima, L.M., Camargo, L.E.A., Pereira, L.F.P., Coutinho, L.L., Lemos, M.V.F., Romano, M.R., Machado, M.A., Costa, M.M.C., Sá, M.F.G., Goldman, M.H.S., Ferro, M.I.T., Tinoco, M.L.P., Oliveira, M.C., Van Sluys, M-A., Shimizu, M.M., Maluf, M.P., Eira, M.T.S., Filho O.G., Arruda, P., Mazzafera, P., Mariani, P.D.S.C., Oliveira, R.L.B.C., Harakava, R., Balbao, S.F., Tsai, S.M., Mauro, S.M.Z., Santos, S.N., Siqueira, W.J., Costa, G.G.L., Formighieri, E.F., Carazzolle, M.F. & Pereira, G.A.G., 2006. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18:95-108.
- Vierstra, R.D., 1993. Protein degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44:385-410.
- Villela, F.A. & Beckert, O.P., 2001. Potencial osmótico de soluções aquosas de polietileno glicol 8000. *Rev. Bras. Sem.*, 23:267-275.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.H.D. & Wu, R., 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.*, 110:249-257.
- Wang, H., Liu, D., Sun, J. & Zhang, A., 2005. Asparagine synthetase gene *TaASN1* from wheat is up-regulated by salt stress, osmotic stress and ABA, *J. Plant Physiol.*, 162:81-89.
- Willson, K.C., 1999. *Coffee, Cocoa and Tea*, CABI Publishing, Cambridge, 300 p.
- Wong, H.K., Chan, H.K., Coruzzi, G.M. & Lam, H.M., 2004. Correlation of *ASN2* gene expression with ammonium metabolism in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 134:332-338.
- Yamada, S., Komori, T., Myers, P.N., Kuwata, S., Kubo, T. & Imaseki, H., 1997. Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.*, 38:1226-1231.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S. & Shinozaki, K. 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.*, 33:217-224.
- Yeo, A., 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.*, 49:913-929.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y. & Shinozaki, K., 1995. Correlation between the induction of a gene for  $\delta\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.*, 7:751-760.
- Zhang, J., Nguyen, H.T. & Blum, A., 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.*, 50:291-302.