



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TIAGO BENEDITO DOS SANTOS

**“EXPRESSÃO DE TRÊS ISOFORMAS DE *GALACTINOL*  
*SINTASE* EM PLANTAS DE *COFFEA ARABICA* L.  
SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS”**

---

Londrina  
2008

TIAGO BENEDITO DOS SANTOS

**“EXPRESSÃO DE TRÊS ISOFORMAS DE *GALACTINOL*  
*SINTASE* EM PLANTAS DE *COFFEA ARABICA* L.  
SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

Londrina  
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S237e Santos, Tiago Benedito dos.  
Expressão de três isoformas de *galactinol* sintase em plantas de *Coffea arabica*  
*L.* submetidas a estresses abióticos / Tiago Benedito dos Santos. – Londrina,  
2008.  
91 f. : il

Orientador: Luiz Gonzaga Esteves Vieira.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Biologia Molecular, 2008.  
Inclui bibliografia.

1. Café – Aspectos genéticos – Teses. 2. Genética vegetal – Teses. 3. Enzimas  
– Regulação – Teses. 4. Oligossacarídeos – Teses. I. Vieira, Luiz Gonzaga Esteves.  
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa  
de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo  
do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 581.169

TIAGO BENEDITO DOS SANTOS

**“EXPRESSÃO DE TRÊS ISOFORMAS DE GALACTINOL SINTASE  
EM PLANTAS DE COFFEA ARABICA L. SUBMETIDAS A  
ESTRESSES ABIÓTICOS”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Alexandre Lima Nepomuceno  
EMBRAPA Soja

---

Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira  
EMBRAPA Café – Brasília/IAPAR

---

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira  
IAPAR – PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2009.

**DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Nadir e Giselda dos Santos  
Aos avós Geraldo Tonéis e (Maria Rosa  
Constantino - *in memória*)**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Senhor por tudo.

Ao Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) pela oportunidade de estágio durante a graduação e até os dias de hoje no Laboratório de Biotecnologia Vegetal– LBI.

Ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina em especial a Sueli Trindade Miranda por toda ajuda.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, pela concessão da bolsa.

Ao orientador Dr. Luiz Gonzaga E. Vieira o meu muito obrigado pelos ensinamentos transmitidos, paciência, incentivo, e por toda contribuição pessoal e moral.

Ao Dr. Luiz Filipe P. Pereira pela oportunidade de estágio “Genopar”, desde a graduação, pelos conhecimentos, atenções e puxões de orelha, amizade, obrigado.

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno por aceitar em participar da banca de defesa contribuindo com suas sugestões.

Ao Dr. Anderson Rotter Meda pela participação na banca de qualificação e pelas sugestões dadas para esse trabalho.

Ao Dr. Celso Jamil Marur e Dr. Fábio S. de Souza pela contribuição nas análises fisiológicas durante os períodos de experimentos, obrigado.

À Dra. Carmen Lucia O. Petkowicz do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná – UFPR, pela disponibilidade em quantificar os oligossacarídeos, enriquecendo esse trabalho.

Às amigas Sandra Maria Bellodi Cação e Lucia Ferreira Pires, por terem participado do início da minha trajetória no LBI, e pelas ajudas, dúvidas, risadas, e pela amizade, obrigado.

À Ilara Gabriela Frasson Budzinski, a quem amo de todo o coração, e que sempre esteve comigo nos momentos de angústias, tristezas, alegrias e conquistas, a você todo meu carinho e muito obrigado.

À Dra. Luciana Grange, Gislaine Vasquez de Souza e Suzana Tiemi pela amizade de ontem, hoje e sempre.

À Dra. Elizabete Keiko Takahashi pelo incentivo, amizade, a você Bete Sam, o meu eterno obrigado.

Às amigas Kenia de Carvalho e Marília K. F. de Campos, pela amizade, conversas....enfim...ohh yes!

Ao Sr. João, Fátima Borges (Fafá), Suely Ario e Lucinéia M. da Silva pela grande amizade aos longos desses anos todos.

Às amigas Simone Castro e Márcia, pela amizade.

Aos amigos do LBI, Diogo Maciel, Iris Tíski, Julia Tufino, Leonardo Rippel, Nathalia Belintani, Nathalia Volpi, Prof. Rosangela e Lídia, pelas descontrações e amizade.

À minha família a quem devo tudo o que sou.

A todos que de alguma maneira contribuíram direta ou indiretamente na minha vida e na minha formação.....obrigado.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema representativo do ciclo fenológico do café, indicando possíveis efeitos de condições com deficiência hídrica. (Extraído de Camargo e Camargo 2001) .....21
- Figura 2** – Representação esquemática (adaptado de Vinocur e Altman, 2005) sobre a via de resposta das plantas aos estresses abióticos .....24
- Figura 3** – Representação esquemática estresse térmico em plantas .....27
- Figura 4** – Representação dos danos causados pelo estresse salino em plantas.....35
- Figura 5** – Estrutura química da rafinose .....37
- Figura 6** – Via da biossíntese de galactinol, rafinose e estaquiose em plantas.....39
- Figura 7** – Análise filogenética de três isoformas de *galactinol sintase* identificadas no Projeto Genoma Café (triângulo preto), e dos organismos que apresentaram maior similaridade: *Coffea canephora*, *Arabidopsis thaliana* (NP\_1822401.1 – *AtGoIS1*; NP\_176053.1 – *AtGoIS2*; NP\_172406.1 – *AtGoIS3*; NP\_176250.1 – *AtGoIS4*; NP\_197768.1 – *AtGoIS5*; NP\_567741.2 – *AtGoIS6*; NP\_176248.1 – *AtGoIS7*) ; *Ajuga reptans* (CAB51533.1 – *AjGoIS1*; CAB51534.1 – *AjGoIS2*); *Triticum aestivum* (BAF51566.1 – *TaGoIS*); *Cucumis melo* (AAL78687.1 – *CmGoIS1*; AAL78686.1 – *CmGoIS2*); *Oryza sativa* (ABF96069 – *OsGoIS*). **B.** Alinhamento das sequências de aminoácidos das isoformas *CaGoIS1,2* e 3 (em vermelho sequências conservadas encontradas entre as isoformas), em asterisco indica região conservada de fosforilação de serina e motivo putativo para ligação-manganês (barra em negrito). Análises realizadas através do programa CLC Main Workbench 4.0 .....58
- Figura 8** – Análise de Dot-Blot para confirmação da especificidade das sondas. **A** – Hibridização específica para *CaGoIS1*. **B** –

- Hibridização específica para *CaGo/S2*. **C** – Hibridização específica para *CaGo/S3* .....60
- Figura 9** – Análise de expressão via Northern blot com RNA total dos diferentes tecidos do cafeeiro: folhas, botão floral, flor, raiz, ramos, endosperma e polpa. **A**= expressão da isoforma *CaGo/S1*. **B**= isoforma *CaGo/S2*. **C**= isoforma *CaGo/S3*. **D**= RNA total para comparação de concentração das diferentes amostras .....61
- Figura 10** – Northern blot de folhas do cultivar IAPAR-59 do experimento de estresse hídrico hibridizada com *CaGo/S1*. **A**= Hibridização constitutiva para a isoforma *CaGo/S1*. **B**= expressão da isoforma *CaGo/S2* em condição de estresse severo. **C**= expressão de *CaGo/S3*. **D**= RNA total para os diferentes níveis de estresse: não estressado, estresse moderado, estresse severo e recuperado .....62
- Figura 11** – Análise de RNA total de folhas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 via Northern blot do experimento de estresse térmico hibridizado com *CaGo/S1*. Expressão apresentada pela isoforma *CaGo/S1* (A), *CaGo/S2* (B) e *CaGo/S3* (C) do estresse térmico (Dia 0), e após 3 e 5 dias de estresse a 37°C (Dia 3 e Dia 5). D= Padrão de RNA total do experimento de estresse térmico .....63
- Figura 12** – Análise de RNA total de folhas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 via Northern blot do experimento de estresse salino hibridizado com *CaGo/S1*. Expressão apresentada pela isoforma *CaGo/S1* (A), *CaGo/S2* (B) e *CaGo/S3* (C) do estresse salino (Dia 0, 6, 12 e 25). D= Padrão de RNA total do experimento de estresse salino .....64
- Figura 13** – Concentração de galactinol, rafinose e estaquiase em folhas de plantas de *C. arabica* L. sob condições de estresse hídrico. Sem estresse (SE), estresse moderado (EM), estresse severo (ES) e recuperado (REC) .....65
- Figura 14** – Concentração de galactinol, rafinose e estaquiase em folhas de plantas de *C. arabica* L. sob condições de estresse térmico.

Sem estresse (Dia 0), estresse moderado (Dia 3), estresse severo (Dia 5).....66

**Figura 15** – Concentração de galactinol, rafinose e estaquiose em folhas de plantas de *C. arabica* L. sob condições de estresse salino. Sem estresse (Dia 0) e 6, 12 e 25 dias após o início do estresse salino (150 mM NaCl.).....67

## LISTA DE ABREVIATURA

|                    |  |
|--------------------|--|
| <b>ABA</b>         | Ácido Abscísico                            |
| <b>ABREs</b>       | ABA – Responsive Element                   |
| <b>CDPK</b>        | Calcium Dependent Protein Kinases          |
| <b>CONAB</b>       | Companhia Nacional de Abastecimento        |
| <b>CTAB</b>        | Brometo de Cetiltrimetilamônio             |
| <b>Cu/Zn-SOD</b>   | Cobre-zinco Superóxido Dismutase           |
| <b>DEPC</b>        | Dietil Pirocarbonato                       |
| <b>DNA</b>         | Ácido Desoxirribonucléico                  |
| <b>DNase</b>       | Desoxirribonucléico                        |
| <b>dNTP</b>        | Desoxinucleotídeo Trifosfato               |
| <b>DRE</b>         | Drought Response Element                   |
| <b>DREB</b>        | Drought – Response-Element-Binding Protein |
| <b>EDTA</b>        | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético         |
| <b>GoIS</b>        | Enzima Galactinol Sintase                  |
| <b><i>GoIS</i></b> | Gene <i>Galactinol Sintase</i>             |
| <b>HPLC</b>        | Cromatografia Líquida de Alta Pressão      |
| <b>HSPs</b>        | Heat Shock Proteins                        |
| <b>LB</b>          | Meio Luria Bertani                         |
| <b>LEA</b>         | Late Embryogenesis Abundant                |
| <b>LiCl2</b>       | Cloreto de Lítio                           |
| <b>MAPK</b>        | Mitogen Activated Protein Kinases          |
| <b>MOPS</b>        | Ácido 3 (N-morfolino) Propanossulfônico    |
| <b>NaCl</b>        | Cloreto de Sódio                           |
| <b>NaOH</b>        | Hidróxido de Sódio                         |
| <b>PCR</b>         | Reação em Cadeia da Polimerase             |
| <b>PVP</b>         | Polivinilpirrolidona                       |
| <b>RFO</b>         | Rafinose                                   |
| <b>RNA</b>         | Ácido Ribonucléico                         |
| <b>RNAse</b>       | Ribonuclease                               |
| <b>ROS</b>         | Espécies Reativas de Oxigênio              |
| <b>RWC</b>         | Relative Water Content                     |

|                                   |                                 |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| <b>SDS</b>                        | Dodecil sulfato de Sódio        |
| <b>SOD</b>                        | Superóxido Dismutase            |
| <b>SOS</b>                        | Salt Overly Sensitive           |
| <b>SPS</b>                        | Sintase da Sacarose-Fosfato     |
| <b>TRIS</b>                       | Tris-(Hidroximetil)-Aminometano |
| <b><math>\alpha</math>-dCTP32</b> | Radioisótopo (Fósforo)          |

SANTOS, Tiago Benedito dos. “**Expressão de três isoformas de *galactinol sintase* em plantas de *coffea arabica* l. Submetidas a estresses abióticos**”. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

Os oligossacarídeos da família da rafinose (RFO) desempenham múltiplas funções nas plantas, principalmente na resposta a estresses ambientais como déficit hídrico, salinidade e temperaturas extremas. Galactinol sintase (GoS) é a enzima que catalisa o primeiro passo da biossíntese dos oligossacarídeos da RFOs e desempenha um papel regulador importante na partição do carbono entre sacarose e RFOs. O objetivo desse estudo foi de avaliar a atividade transcricional do gene *GoS* no cafeeiro sob diversas condições de estresses abióticos e quantificar os oligossacarídeos pertencentes a família da RFO. Foram realizadas buscas dentro do banco de dados do Projeto Genoma Café para a identificação e caracterização das isoformas de *GoS*. As três isoformas *CaGoS1*, *CaGoS2* e *CaGoS3* apresentam regiões codantes variando de 334 a 344 aminoácidos. Todas as isoformas apresentam o mesmo domínio de glicosiltransferase 8, que é uma característica da família das RFOs, incluindo a GoS. Através da análise do perfil transcricional da isoforma *CaGoS1*, foi observada a expressão basal desse gene em condições normais de irrigação com um aumento transcricional acentuado em plantas submetidas a déficits hídricos moderado, severo e na recuperação após o estresse. A isoforma *CaGoS2* apresentou uma expressão claramente detectável somente em condições de estresse severo. A isoforma *CaGoS3* também apresentou um aumento pronunciado de transcritos nas folhas quando a planta foi submetida a um estresse hídrico severo. Nos estágios de estresse moderado e recuperado foram observados sinais de hibridização, mas em níveis mais baixos, não sendo verificada a transcrição nas plantas com condições normais de suprimento de água. No estresse salino *CaGoS1* é expresso constitutivamente em folhas durante todo o período de estresse, enquanto que a isoforma *CaGoS2* é expressa somente sob condições de estresse. O nível transcricional para *CaGoS3* foi detectado em níveis mais baixos que as isoformas anteriores nesse tipo de estresse. Durante o estresse térmico a isoforma *CaGoS1* apresentou um aumento da atividade transcricional no terceiro dia e diminuindo no quinto dia de estresse. A expressão de *CaGoS2* não foi detectada ou observado de modo muito tênue em folhas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59. A presença de transcritos de *CaGoS3* foi detectada apenas durante o terceiro dia de estresse. Através dos dados de expressão gênica foi possível observar que as três isoformas de *CaGoS1*, 2 e 3 apresentaram diferenças no padrão transcricional em folhas de *C. arabica* durante a submissão dos diferentes estresses abióticos. Com base nas quantificações é possível confirmar que a rafinose e estaquiase devem estar atuando na osmoproteção de *C. arábica* durante os estresses abióticos.

**Palavras-chave:** Café. Estresses abióticos. *Galactinol sintase*.

SANTOS, Tiago Benedito dos. “**Expression of three isoforms of galactinol synthase in plants of *Coffea arabica* I. Subjected to abiotic stress**”. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## ABSTRACT

Raffinose family oligosaccharides (RFOs) play multiple roles in plants, mainly in response to environmental stresses such as drought, salinity and extreme temperatures. Galactinol synthase (GoS) is the enzyme that catalyzes the first step of the biosynthesis of oligosaccharides of RFOs and plays an important regulatory role in the partition of carbon between sucrose and RFOs. The aim of this study was to evaluate the transcriptional activity of the gene *GoS* in coffee under varying conditions of abiotic stress and quantify oligosaccharides belonging to the family of the RFO. Searches were conducted within the database of the Coffee Genome Project for the identification and characterization of isoforms of *GoS*. The three isoforms *CaGoS1*, *CaGoS2* and *CaGoS3* have coding regions ranging from 334 to 344 amino acids. All isoforms have the same domain of glycosyltransferase 8, which is a characteristic of the family of RFOs, including GoS. By examining the transcriptional profile of *CaGoS1* isoform, it was observed a basal expression of this gene in normal conditions of irrigation, with a prominent increase in transcription in plants submitted to moderate and severe water deficits and at the recovery period. The expression of *CaGoS2* isoform was clearly detectable only in conditions of severe stress. The *CaGoS3* isoform also showed a pronounced increase of transcripts in leaves when plant was submitted to severe water stress. There were signs of hybridization in periods of moderate stress and recovery, but at lower levels, not being detected expression in plants with normal conditions of water supply. *CaGoS1* was constitutively expressed in leaves during the whole period of salt stress, while *CaGoS2* isoform was expressed only under conditions of stress. Transcription was detected in *CaGoS3* in levels lower than the previous isoforms in this type of stress. During heat stress, *CaGoS1* isoform presented increased transcriptional activity on the third day and decreased on the fifth day of stress. The expression of *CaGoS2* was not detected or observed very subtly in leaves of *Coffea arabica* cv. IAPAR-59. The presence of transcripts of *CaGoS3* was detected only during the third day of stress. Using data from gene expression, it was observed that the three isoforms of *CaGoS1*, 2 and 3 showed differences in transcriptional pattern in leaves of *C. arabica* during the submission of different abiotic stresses. Based on the measurements, it was possible to confirm that raffinose and stachyose must be acting in osmoprotection of *C. arabica* during abiotic stresses.

**Keywords:** *Coffea*. Abiotic stress. *Galactinol synthase*.

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 16 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 18 |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | 19 |
| 3.1      | HISTÓRICO DO CAFÉ.....   | 19 |
| 3.1.1    | Importância Econômica do Café.....   | 19 |
| 3.1.2    | Características Morfológicas e Fenológicas de <i>Coffea</i> SP .....   | 20 |
| 3.1.3    | Mecanismo de Reposta aos Estresses abióticos .....   | 22 |
| 3.1.4    | Mecanismo de Resposta ao Estresse térmico.....   | 27 |
| 3.1.5    | Resposta ao Estresse hídrico.....  | 29 |
| 3.1.6    | Resposta ao Estresse salino .....  | 33 |
| 3.2      | OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA DA RAFINOSE NOS VEGETAIS.....  | 36 |
| 3.2.1    | Biossíntese de Oligossacarídeos da Família de Rafinose.....  | 39 |
| <b>4</b> | <b>EXPRESSÃO DE GALACTINOL SINTASE (GOLS)</b> .....  | 41 |
| <b>5</b> | <b>ARTIGO A</b> .....  | 44 |
| 5.1      | EXPRESSÃO DE TRÊS ISOFORMAS DE <i>GALACTINOL SINTASE</i> EM PLANTAS DE<br><i>COFFEA ARABICA</i> L. SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS..... | 44 |
| 5.1.1    | Introdução.....  | 46 |
| 5.2      | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 48 |
| 5.2.1    | Busca pelo Gene <i>Galactinol Sintase (Gols)</i> .....   | 48 |
| 5.2.2    | Experimento de Estresse hídrico .....  | 49 |
| 5.2.3    | Experimento de Estresse térmico .....  | 50 |
| 5.2.4    | Experimento de Estresse salino .....   | 51 |
| 5.2.5    | Extração de RNA total .....  | 51 |
| 5.2.6    | Sequenciamento.....  | 52 |
| 5.2.7    | Dot Blot.....  | 53 |
| 5.2.8    | Northern Blot .....  | 53 |
| <b>6</b> | <b>QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS</b> .....   | 55 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 6.1      | EXTRAÇÃO E ANÁLISE CARBOIDRATOS .....  | 55        |
| <b>7</b> | <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>56</b> |
| 7.1      | IDENTIFICAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE <i>GALACTINOL SINTASE</i> .....  | 56        |
| 7.2      | CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> DO cDNA DE TRÊS ISOFORMAS DE <i>GALACTINOL SINTASE</i> EM <i>COFFEA ARABICA L</i> .....  | 57        |
| 7.3      | DOT BLOT.....  | 60        |
| 7.4      | NORTHERN BLOT DE DIFERENTES TECIDOS DE <i>COFFEA ARABICA L</i> . COM AS ISOFORMAS <i>CAGOLS1</i> , <i>CAGOLS2</i> E <i>CAGOLS3</i> .....                         | 60        |
| 7.5      | ANÁLISE DE NORTHERN BLOT DO EXPERIMENTO DE ESTRESSE HÍDRICO EM <i>COFFEA ARABICA L</i> . COM AS ISOFORMAS <i>CAGOLS1</i> , <i>CAGOLS2</i> E <i>CAGOLS3</i> ..... | 61        |
| 7.6      | ANÁLISE DE NORTHERN BLOT DO EXPERIMENTO DE ESTRESSE TÉRMICO EM <i>COFFEA ARABICA L</i> . COM AS ISOFORMAS <i>CAGOLS1</i> , <i>CAGOLS2</i> E <i>CAGOLS3</i> ..... | 63        |
| 7.7      | ANÁLISE DE NORTHERN BLOT DO EXPERIMENTO DE ESTRESSE SALINO EM <i>COFFEA ARABICA L</i> . COM AS ISOFORMAS <i>CAGOLS1</i> , <i>CAGOLS2</i> E <i>CAGOLS3</i> .....  | 64        |
| <b>8</b> | <b>QUANTIFICAÇÕES DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA DA RAFINOSE (RFOS) .....</b>   | <b>65</b> |
| 8.1      | ESTRESSE HÍDRICO .....   | 65        |
| 8.2      | ESTRESSE TÉRMICO .....   | 66        |
| 8.3      | ESTRESSE SALINO .....  | 67        |
| <b>9</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>  | <b>68</b> |
| 9.1      | ANÁLISES <i>IN SILICO</i> .....  | 68        |
| 9.2      | ANÁLISES MOLECULARES.....  | 69        |
| 9.2.1    | Northern Blot dos Diferentes Tecidos de <i>Coffea Arabica</i> cv. IAPAR-59 com as Isoformas <i>CaGoS1</i> , 2 e 3.....   | 69        |
| 9.2.2    | Northern Blot do Experimento de Estresse hídrico com as Isoformas <i>CaGoS1</i> , 2 e 3.....   | 70        |
| 9.2.3    | Northern Blot do Experimento de Estresse térmico com as Isoformas <i>CaGoS1</i> , 2 e 3.....   | 72        |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 9.2.4 | Northern Blot do Experimento de Estresse Salino com as Isoformas <i>CaGolS1</i> , 2 e 3..... | 73 |
| 9.2.5 | Acúmulo de Galactinol, Rafinose e Estaquiase durante os Estresses abióticos .....            | 74 |
|       | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 76 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 77 |

## 1 INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas no mundo, sendo produzido por mais de 70 países. O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial, segundo levantamentos realizados pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) a produção nacional de café está estimada em 45.850 mil sacas de 60 quilos de café beneficiado (CONAB, 2008).

A introdução do café no Brasil deu-se por volta de 1727, a partir do estado do Pará. A cultura cafeeira expandiu-se rapidamente em direção aos estados do Sudeste, onde encontrou condições endofoclimáticas favoráveis para o seu cultivo, tornando-se anos mais tarde um esteio econômico e político durante quase todo período do século XIX. Atualmente do total de café produzido, aproximadamente 70% corresponde ao *Coffea arabica* enquanto que 30% são representados por *Coffea canephora* (VIEIRA et al., 2006).

Os estresses abióticos tais como seca, salinidade, altas e baixas temperaturas, podem reduzir de maneira significativa a produção na agricultura. Quando o estresse hídrico se torna elevado no cafeeiro, vários sintomas aparecem, tal como, murcha e desfolha, morte das raízes e dos ramos, podendo também dependendo da gravidade do estresse levar a deficiência nutricional da planta. Os estresses abióticos desencadeiam uma cascata de respostas nas plantas, desde sua percepção, ativação das rotas de sinalização e alterações em nível de expressão gênica, levando, conseqüentemente às alterações fisiológicas no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Os açúcares utilizados no metabolismo de várias plantas são de extrema importância, podendo agir diretamente na regulação fonte-dreno, além de controlar a ação de diversos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de açúcares. Diversos estudos têm atribuído várias funções fisiológicas desempenhada pelos oligossacarídeos da família da rafinose (RFO) nas plantas, servindo, por exemplo, como soluto compatível para proteção das células contra os estresses abióticos. A via de síntese destes açúcares já está bem estabelecida, sendo que a enzima galactinol sintase (GolS) é a enzima responsável pelo primeiro passo na formação de RFO e objeto de estudo neste trabalho. O acúmulo desses carboidratos pode ser uma forma da planta se adaptar às condições de estresses

abióticos. O desenvolvimento tanto de cultivares mais tolerantes a períodos de déficit hídrico, assim como de novas tecnologias que auxiliem as plantas a tolerar períodos prolongados de estiagem, são de extrema importância para a sustentabilidade da produção agrícola brasileira e mundial.

O Brasil tem buscado lugar de destaque nas pesquisas genéticas de plantas, sendo que os cientistas brasileiros estão aumentando o conhecimento sobre o genoma de diversas plantas e outros organismos, incluindo o genoma do cafeeiro. O domínio do código genético auxiliará no desenvolvimento de variedades mais produtivas, tolerantes a variações climáticas e resistentes ao ataque de pragas e doenças que hoje são controladas com defensivos agrícolas (VIEIRA et al., 2006).

Com a finalização do Projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>), um conjunto de 200.000 seqüências expressas (ESTs) em diversos tecidos, em diferentes etapas de desenvolvimento e também em diversas condições ambientais, estão disponíveis para estudos *in silico* e *in vitro*. Portanto, com as novas tecnologias disponíveis na área de genômica, a utilização de técnicas da biologia molecular em estudos funcionais das respostas das plantas de cafeeiro a estresses abióticos deve proporcionar um grande avanço para o esclarecimento e o entendimento das deficiências e limitações ambientais para esta cultura.

## 2 OBJETIVOS

Visando buscar maiores informações sobre o mecanismo de expressão gênica em plantas de cafeeiro submetidas a diferentes estresses abióticos, este trabalho teve como objetivo:

- Identificação e caracterização de cDNAs que codificam a enzima Galactinol sintase (GoIS) através do banco de dados do Projeto Genoma Café;
- Estudar a expressão transcricional de isoformas deste gene em tecidos de cafeeiro submetidos a diferentes tipos de estresse abióticos;
- Quantificar os oligossacarídeos derivados da via biossintética do galactinol em plantas de cafeeiro submetidas a condições de estresses abióticos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 HISTÓRICO DO CAFÉ

Estudos históricos indicam que o centro de origem do cafeeiro é da região de Kaffa, atual Etiópia. Por volta do século XV o café passou a ser consumido no Oriente Médio, sendo constatado que os árabes foram os primeiros a cultivar o café, por essa razão originou-se o nome científico da principal espécie cultivada de café *Coffea arabica*. A primeira denominação botânica foi feita por Antoine de Jussieu em 1714, sendo incluída na família Oleaceae como *Jasminum arabicum laurifolia*. Anos mais tarde em 1737 Linnaeus descreve o gênero *Coffea* e a espécie *Coffea arábica* L. (WRIGLEY, 1998).

A introdução do café Arábica no Brasil foi por volta de 1727, provindo da Guiana Francesa. As primeiras sementes e mudas foram plantadas em Belém (PA), e posteriormente levadas para o estado do Maranhão. Em seguida sua expansão começou pela Costa Atlântica do Nordeste brasileiro, seguindo para o Rio de Janeiro em 1774, onde a planta iniciou sua maior expansão até atingir o Vale do Paraíba no estado de São Paulo por volta de 1790. Durante quase um século, o café foi considerado a maior riqueza brasileira, e as divisas geradas pela economia cafeeira aceleraram o desenvolvimento do Brasil e o inseriram nas relações internacionais de comércio (BELING et al., 2005).

##### 3.1.1 Importância Econômica do Café

A cafeicultura tem sido por décadas uma das mais importantes atividades agrícolas no Brasil, colocando-o como maior produtor mundial e sendo responsável pela incorporação de novas fronteiras agrícolas. O café é a segunda *commodity* mais valorizada nos mercados internacionais, ficando atrás somente do petróleo (LEROY et al., 2006).

A cafeicultura tem uma importância fundamental na criação de novos empregos e na fixação do homem no campo. *C. arabica* compreende 70% do

mercado, enquanto que *C. canephora* ocupa 30% (VIEIRA et al., 2006). Atualmente, os principais estados produtores são Minas Gerais, maior produtor brasileiro com 50,1% da produção nacional, seguido do Espírito Santo com 23%, São Paulo 10,2%, Paraná 5,2%, Bahia 5,0% e Rondônia com 3,9%, (CONAB, 2008). A produção nacional para a safra do ano 2008 está estimada em 45.850 milhões sacas de 60 Kg de café beneficiado, superando a safra passada em 35% (CONAB, 2008).

A produção mundial de café deve chegar a 118,1 milhões de sacas de 60 Kg na safra 2007/2008 e a tendência é aumentar para 131 milhões de sacas de 60 Kg na safra 2008/2009. O aumento da receita da cafeicultura pode não se traduzir em boa rentabilidade para os produtores, devido a aumentos dos custos de produção principalmente de mão-de-obra, o alto preço dos adubos, e pelas mudanças climáticas, como a falta de ocorrência de chuvas em regiões produtoras.

Dados da CONAB (2008) mostraram que as condições climáticas adversas em 2007 caracterizada por uma deficiência hídrica acentuada e prolongada, afetaram o potencial produtivo das lavouras nas principais regiões produtoras de café pelo desfolhamento e floradas irregulares e com intensidade variável.

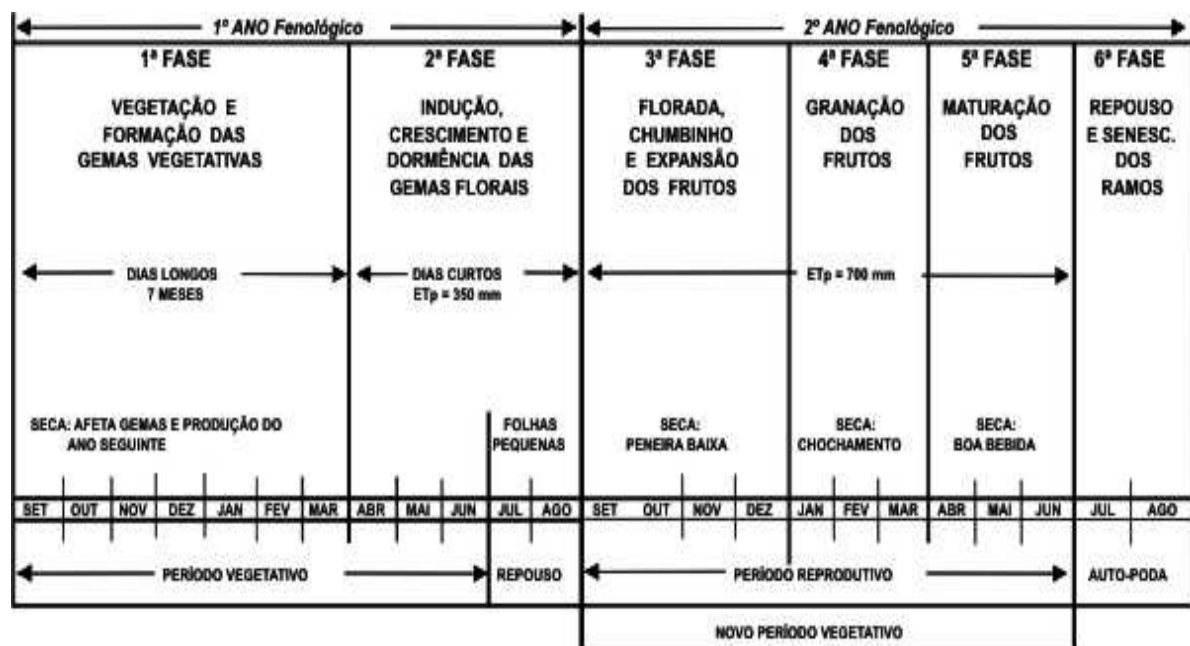
### 3.1.2 Características Morfológicas e Fenológicas de *Coffea* SP

O café é uma planta perene dicotiledônea do gênero *Coffea* da família Rubiaceae (KEMSLEY et al., 1995; EIRA et al., 2006), sendo descritas aproximadamente 100 espécies do gênero *Coffea* (CARVALHO et al., 2001). As mais importantes são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que correspondem a cerca de 70% e 30% da produção mundial.

*C. arabica* é uma planta de porte arbustivo ou arbóreo podendo atingir 4m, com caule lenhoso, folhas persistentes e flores hermafroditas, apresenta altos níveis de autofecundação e é a única espécie tetraplóide ( $2n = 4X = 44$  cromossomos) dentro gênero (LASHERMES et al., 1999; ANTONY et al., 2002). É uma planta exigente em termos de cuidados na nutrição, clima e apresenta uma intolerância a altas temperaturas e ao frio (THOMAZIELLO et al., 2000). *C. arabica* é preferido às demais espécies de café devido à melhor qualidade da bebida (DE

CASTRO; MARRACCINI, 2006). Essa espécie se originou na Etiópia, a partir da hibridização natural entre duas espécies ancestrais diplóide, *Coffea eugenioides* ( $2n = 2x = 22$  cromossomos) e *C. canephora* ( $2n = 2x = 22$  cromossomos), (LASHERMES et al., 1997), que são originárias da África Central. O *C. canephora* é planta de regiões mais quentes, originária do Congo, sendo considerada uma espécie rústica e pouco exigente no seu tratamento nutricional e na temperatura. Apesar de fornecer uma bebida de qualidade inferior ao *C. arabica*, o *C. canephora* tem expandido sua produtividade no Brasil e no mundo.

Existem outras espécies de café, que apesar de não serem utilizadas comercialmente, servem como objeto de estudo em programas de melhoramento genético, como por exemplo, a espécie *C. racemosa*, que apresenta características é a abundante floração e maturação precoce dos frutos, assim como resistência a nematóides e ao minador de folhas *Leucoptera coffeella* (bicho-mineiro) (GUERREIRO FILHO, 1992).



**Figura 1** – Esquema representativo do ciclo fenológico do café, indicando possíveis efeitos de condições com deficiência hídrica. (Extraído de Camargo e Camargo 2001).

Segundo Camargo e Camargo (2001) o ciclo fenológico do cafeeiro, para as condições climáticas tropicais do Brasil, é subdividido em seis fases distintas que envolvem os dois ciclos fenológicos: vegetação e formação das gemas foliares,

indução e maturação das gemas florais, florada, granação dos frutos, maturação dos frutos e repouso e senescência dos ramos terciários e quartenários.

Contudo, a duração dessas fases depende da cultivar, das condições climáticas, da idade da planta e principalmente temperatura e deficiência hídrica (GOUVEIA, 1984). Durante o segundo ano fenológico ocorre uma etapa importante que é a florada, onde é iniciada a formação dos chumbinhos e expansão dos grãos. O estresse hídrico nessa fase poderá prejudicar de maneira significativa o crescimento dos frutos, resultando numa baixa produtividade. A fase seguinte ocorre a granação dos frutos, sendo que períodos severos de estiagem podem acarretar problemas na formação do grão do fruto. Contudo, a maturação dos frutos acontece a partir de abril, e a deficiência hídrica moderada nessa etapa pode ser benéfica para a qualidade de bebida.

### 3.1.3 Mecanismo de Reposta aos Estresses abióticos

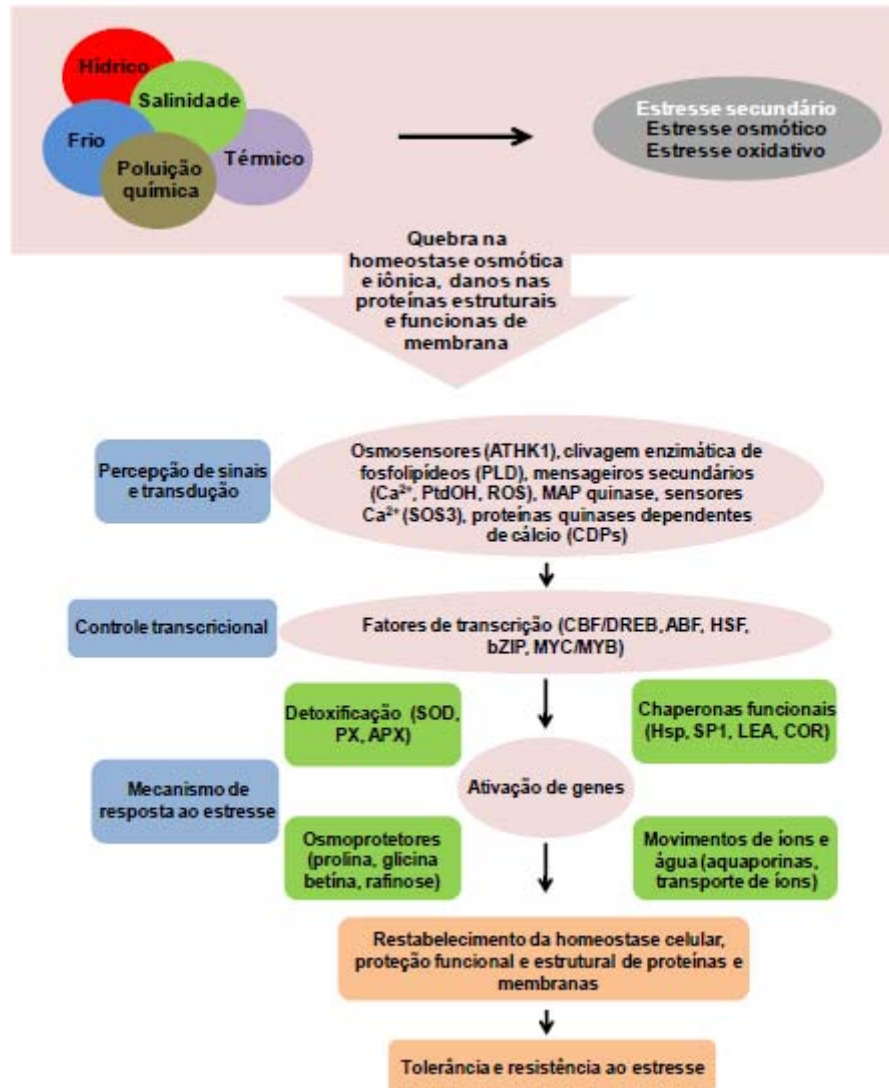
Segundo Lancher (2000), o estresse pode ser definido como um conjunto de reações de um organismo à agressões de ordem física, fisiológica, ou de outra natureza, capaz de interferir em seu estado normal de equilíbrio, ou seja, na sua homeostase. O fator responsável pela alteração do estado de equilíbrio de um organismo é designado como agente estressante (TAIZ; ZEIGER, 2004). Portanto, em função da natureza do agente estressante pode-se qualificar o tipo de estresse como bióticos (patógenos, inseto-praga, homem etc) e os abióticos (seca, salinidade, baixas temperaturas, deficiência nutricional, além de outros).

Os estresses abióticos têm influenciado de maneira negativa na agricultura, como na cafeicultura. O potencial produtivo das lavouras de café, por exemplo, no estado de Minas Gerais foi consideravelmente afetado pelas condições climáticas adversas observadas até o momento. A estiagem prolongada provocou desfolhamento em grande parte das lavouras nas diferentes regiões produtoras. As floradas ocorreram de forma irregular, com intensidade variável. O déficit hídrico acentuado, aliado a altas temperaturas, provocou um elevado percentual de abortamento de flores e queda de chumbinhos em praticamente todas as regiões (CONAB, 2008).

Entre todos os tipos de estresse abióticos, a seca e os extremos de temperatura são os que mais afetam o desenvolvimento vegetal. As plantas respondem ao estresse hídrico e às altas e baixas temperaturas com um número diverso de mudanças relacionadas ao seu desenvolvimento e a sua fisiologia (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2003). Inúmeras são as respostas moleculares e celulares atribuídas a estes tipos de estresse, onde têm sido analisadas extensivamente sob o ponto de vista do acúmulo de diversos tipos de açúcares como rafinose, sacarose, sorbitol e trehalose (TAJI et al., 2002), aminoácidos como prolina (MOLINARI et al., 2007; PARVANNOVA et al., 2004); e aminas (glicina betaína e poliaminas) (BARTELS et al., 2005).

Portanto, a resposta fisiológica para estresses abióticos vem acompanhada de mudanças na expressão gênica (Figura 2). Vários genes induzidos pela seca, e outros tipos de estresse abióticos podem desencadear uma comunicação cruzada (cross-talk), entre essas vias de sinalização, gerando a interação de diferentes elementos envolvidos na expressão de genes, podendo levar a interação na expressão gênica (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Várias estratégias têm sido utilizadas para isolar e identificar genes que estão envolvidos na resposta ao estresse, porém o maior desafio agora é integrar a função biológica desses genes e gerar uma compreensão global sobre o processo de sinalização do estresse (BOHNERT et al., 2006; VALLIYODAN; NGUYEN, 2006).



**Figura 2** – Representação esquemática (adaptado de Vinocur e Altman, 2005) sobre a via de resposta das plantas aos estresses abióticos.

Em plantas o hormônio ABA (ácido abscísico) desempenha um papel importante na resposta das plantas a diferentes tipos de estresses abióticos. No entanto, alguns trabalhos descrevem que na indução de genes envolvidos na desidratação das plantas nem todos são induzidos pelo ABA, sugerindo a provável distinção de duas cascatas de transdução de sinais, uma via não dependente e outra independente de ABA (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Foram descritas até o momento seis vias de transdução de sinais envolvidos na resposta da planta ao estresse hídrico: duas vias de ABA dependentes (tipo 2 e 3) e quatro ABA não dependentes (tipo 1,4,5,6) (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SCHINOZAKI, 2006; SEKI et al., 2003). Duas famílias de fatores de transcrição bZIP e MYC/MYB

estão envolvidas na sinalização, a partir do ABA e na ativação de genes (WANG et al., 2003). Alguns genes induzidos pelo ABA compartilham da região consenso do promotor (C/T)ACGTGGC, esta região é conhecida como elemento responsivo ao ABA (ABRE), possuindo a ação *cis*. A via de ABA dependente tipo 2 utiliza a síntese de certas proteínas para ativar os fatores de transcrição MYC/MYB (ABE et al., 1997), ou motivos protéicos do tipo bZIP, os quais ligam-se a regiões do DNA como os ABREs (ABA-Responsive Elements). A via ABA dependente do tipo 3 vai ativar o fator bZIP, acionando a expressão gênica através da ligação com os elementos ABA responsivos ABREs/ABFs (SUNG et al., 2003; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SCHINOZAKI, 2000).

As vias não dependentes de ABA do tipo 4 e 5 levam a indução da expressão gênica ativada através de DREB (Drought – Response-Element-Binding Protein) que se liga ao elemento relacionado a resposta à seca DRE (Drought Response Element) (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SCHINOZAKI, 2000). Seki et al. (2002) identificou através de microarranjos de cDNA em *Arabidopsis thaliana* 299 genes relacionados a seca, 54 genes relacionados a baixas temperaturas, 213 genes a alta concentração salina e 245 genes relacionados a ABA induzido. Mais da metade desses genes relacionados à seca, salinidade, baixas temperatura e ao ABA podem desempenhar uma comunicação cruzada (cross-talk) entre os diferentes estresses.

Segundo Maruyama et al. (2004) foram identificados 38 genes ativados pelo fator de transcrição DREB1A utilizando microarranjos de cDNA, em plantas de *A. thaliana* com a construção 35S:DREB1A, submetidas ao frio. Estes genes codificam proteínas com diferentes funções, podendo ser classificadas em dois grupos. O primeiro grupo inclui proteínas que funcionam na tolerância ao estresse como, proteínas LEA (*Late Embryogenesis abundant*), proteínas anticongelamento, proteínas hidrofílicas, proteínas de ligação ao RNA, transportadores de açúcar e envolvidos na biossíntese de açúcares, como o galactinol. O segundo grupo contém proteínas envolvidas na regulação da transdução de sinal e na expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse, como fatores de transcrição e enzimas que participam do metabolismo de fosfolípidios como a fosfolipase C (MARUYAMA et al., 2004).

Outros efeitos observados durante o período de estresses é a degradação de proteínas envolvidas no fotossistema II (PSII) (proteínas D1 e D2) e

a precipitação de várias moléculas (EDREVA, 2005). A proteína D1 está localizada no centro de reação do PSII, onde os cloroplastos estão envolvidos na captura de fótons. O estresse hídrico e as baixas temperaturas, ao modificarem a fluidez da membrana e danificar os aminoácidos aromáticos da proteína D1, podem levar a diminuição da eficiência quântica do aparato fotossintético levando ao fenômeno conhecido como fotoinibição. Como consequência, pode ocorrer à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que tem efeito deletério sobre os pigmentos de cloroplastos e ao complexo de proteínas deste aparato (EDREVA, 2005).

As plantas para garantir a sua sobrevivência sob condições extremas, utilizam como mecanismos de defesa como o ajustamento osmótico que irá permitir a manutenção do turgor celular e de alguns processos que dependem deste turgor, como expansão e crescimento celular, abertura dos estômatos e fotossíntese.

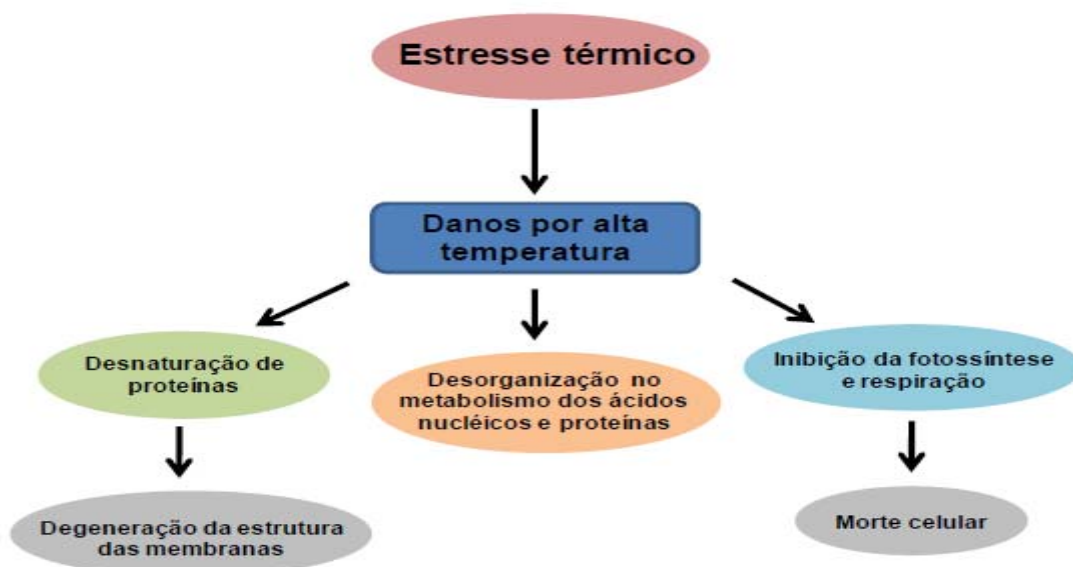
A família dos oligossacarídeos da rafinose (RFOs) - galactinol, estaquiose e verbascose, também podem exercer um papel importante na tolerância aos estresses, principalmente estresse hídrico (TAJI et al., 2002). Os RFOs estão presentes em várias famílias de plantas superiores, em particular abundante em sementes podendo ser acumulados durante o estresse em outros tecidos (CASTILLO et al., 1990). Peterbauer et al. (2001), relatam que o mecanismo da maturação de sementes em *Pisum sativum* L. é realizado através da conversão da sacarose para rafinose durante os períodos de dessecação, e que também são responsáveis pela estabilização da membrana.

A galactinol sintase (EC 2.4.1.123 - GoIS) é a enzima responsável pela produção de rafinose, está envolvida na regulação da partição do carbono, como também está diretamente implicada em muitos processos do desenvolvimento fisiológico nas plantas e na resposta a estresses abióticos (PANIKULANGARA et al., 2004). Estudo com plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* revelou uma alta expressão do gene *galactinol sintase (AtGoIS2)* (TAJI et al., 2002). Plantas transgênicas de *A. thaliana* apresentaram tolerância à seca e ao frio (AVONCE et al., 2004) e acumularam altos níveis de galactinol e rafinose do que as plantas não transformadas (TAJI et al., 2002; VALLIYODAN et al., 2006). Esses estudos sugerem que altas concentrações de galactinol e rafinose podem estar desempenhando o papel de osmoprotetores durante o período de estresse hídrico na planta.

Os estudos de padrão da expressão gênica em resposta aos estresses abióticos em diferentes plantas revelaram uma possível comunicação entre a via de resposta a estes estresses devido à expressão comum entre alguns genes (KREPS et al., 2002; HOUDE et al., 2006). Apesar dos avanços recentes, muitos estudos ainda são necessários sobre a expressão gênica e sobre proteínas que são alteradas em condições de estresse hídrico. A identificação e compreensão da funcionalidade dos genes e proteínas que podem ser alteradas pelo estresse hídrico, levarão a um maior entendimento das rotas de tolerância que são ativadas em muitas espécies.

### 3.1.4 Mecanismo de Resposta ao Estresse térmico

Fatores abióticos como alta temperatura e a falta de disponibilidade hídrica afetam o crescimento e o desenvolvimento de muitas plantas. O estresse térmico causa inúmeros danos às plantas como desnaturação de proteínas, desorganização no metabolismo de ácidos nucléicos e proteínas, degeneração da estrutura das membranas e inibição da fotossíntese (Figura 3).



**Figura 3** – Representação esquemática estresse térmico em plantas.

A aclimatação a temperaturas elevadas, denominada como termotolerância, é fundamental para as plantas em ambientes favoráveis para a ocorrência destes fenômenos. A expressão de vários genes com funções regulatórias, como fatores de transcrição, proteínas de RNA-binding, proteínas de cálcio – binding, quinases, fosfatases, são modificadas pelo estresse. Esses genes provavelmente estão envolvidos não só na regulação pós transcricional, mas também na resposta, percepção e sinalização do estresse (XIONG et al., 2002; ZHU, 2002;).

A biosíntese de ABA é de extrema importância para a termotolerância (GILMOUR; THOMASHOW, 1991; LARKINDALE; VIERLING, 2005), apresentando também um papel fundamental na inibição da germinação em altas temperaturas (TAMURA et al., 2006; TOH et al., 2008). As respostas das plantas às altas temperaturas também estão relacionados com o aumento do conteúdo de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, enquanto que em baixas temperaturas ocorre o aumento da síntese dos poliinsaturados (predominam os trienóicos) (WALLIS; BROWSE, 2002; FALCONE et al., 2004). A indução ao estresse térmico (HS) pode causar danos à membrana celular e na conformação das proteínas, podendo ocorrer à produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), desencadeando estresse oxidativo (LARKINDALE; KNIGHT, 2002). Em *Solanum lycopersicum* acredita-se que HSF1 exerça um papel importante na cascata transcricional na aquisição da termotolerância (MISHRA et al., 2002). O excesso de calor também pode levar promover a morte celular programada (SWIDZINSKI et al., 2002; VACCA et al., 2004). Nas plantas esses tipos de danos podem levar a redução da fotossíntese, afetar o transporte a translocação de assimilados e reduzir o ganho de carbono, ocasionando grandes alterações no crescimento e reprodução (HALL, 2001).

A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais sensíveis ao estresse térmico nas plantas (BERRY; BJORKMAN, 1980; WEIS; BERRY, 1988). A fotossíntese e a respiração podem ser inibidas sob temperaturas elevadas, porém com o aumento da temperatura as taxas fotossintéticas caem antes das taxas respiratórias. A temperatura na qual a quantidade de CO<sub>2</sub> fixado pela fotossíntese iguala-se à quantidade de CO<sub>2</sub> liberado por respiração, em um determinado intervalo de tempo, sendo denominado ponto de compensação da temperatura (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Ainda como resposta primária ao estresse térmico, as plantas respondem através da síntese de um grupo de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*-HSPs) que estão associadas com a obtenção de termotolerância. As HSP são altamente conservadas e diversas classes, têm sido descritas, inclusive em plantas. Elas são designadas pelos seus pesos moleculares aproximados em KDa (HSP110, HSP90, HSP70, HSP60) (COOPER, 1997). As famílias de HSP70 e HSP60 parecem ser particularmente importantes nas rotas de dobramento de proteínas em células de eucariotos e procariotos. Ambas as famílias funcionam ligando-se as regiões não dobrados das cadeias peptídicas, sugerindo que sua função possa estar relacionada com manutenção da correta estrutura terciária de certas proteínas (COOPER, 1997).

Várias alterações provocadas pela alta temperatura e também pelo levam ao aumento nos níveis de prolina, sacarose e outros oligossacarídeos da família da rafinose (galactinol, rafinose, estaquiose e verbasquiose) (GILMOUR et al., 2000). Segundo Panikulagara et al. (2004), a expressão do gene *galactinol sintase* (*GoIS1*), enzima limitante na síntese desses oligossacarídeos, foi induzida por estresse térmico em plantas de *A. thaliana* não transformadas. Esses autores sugeriram que a expressão de *GoIS1* é mediada pelo fator de transcrição HSF em resposta ao estresse térmico.

Através da combinação de vários tipos de estresses em *A. thaliana*, foi observado que a expressão das isoformas de *galactinol sintase* *GoIS1* e *GoIS2* foi induzida pelo fator HSF3 (NISHIZAWA et al., 2006). Com base nesses trabalhos, foi proposto que o mecanismo de ação de galactinol e rafinose está relacionado com a proteção das células vegetais contra os danos oxidativos causados pelos diferentes estresses (NISHIZAWA et al., 2008).

### 3.1.5 Resposta ao Estresse hídrico

Quando o suprimento de água no solo se torna escasso para a planta desenvolve-se o estresse hídrico, que pode ocasionar eventualmente na redução da fotossíntese e afetar todo o metabolismo e morfologia da planta, prejudicando de maneira significativa a produtividade de qualquer cultura. Genes

induzidos pelo déficit hídrico promovem: tolerância da célula contra desidratação; funções de proteção no citoplasma; alterações no potencial osmótico celular para aumentar a absorção de água; controle da acumulação de íons; regulação adicional de expressão gênica; metabolização de compostos degradados pelo estresse etc (NEPOMUCENO et al., 2000).

Mudanças morfológicas, fisiológicas e de desenvolvimento de plantas apresentam bases moleculares e genéticas. Desta forma, a caracterização de genótipos tolerantes e sensíveis à seca é um passo para a seleção e manipulação genética (TUNER, 1997). A tolerância ao estresse hídrico não é uma característica simples, mas um complexo de mecanismos que podem funcionar em conjunto ou isoladamente para tolerar períodos prolongado de estresse (CASAGRANDE et al., 2001).

Os mecanismos moleculares de resposta à seca começam a partir da percepção dos sinais de estresse (XIONG, 2002). Após a percepção do estresse, outros mecanismos são acionados pela planta, como hormônios ou mensageiros secundários que podem dar início à cascata de eventos moleculares.

Quando submetidas a condições de estresse hídrico, as plantas disparam uma cascata de sinalização, podendo ser dependente ou não do ABA, que culmina com a ativação de uma série de mecanismos de respostas responsáveis por conferir tolerância ao estresse. A expressão de vários genes é induzida nessa situação e alguns fatores de transcrição já foram identificados como reguladores de diversas etapas relacionadas com a resposta ao estresse hídrico, como CBF/DREB e ABF (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). Estudos com fatores de transcrição da família homeobox revelaram que esses fatores também podem estar envolvidos na resposta da planta à seca (HENRIKSSON et al., 2005), sendo que todos os genes homeobox relacionados até o momento com a resposta ao estresse hídrico fazem parte da sub-família HD-Zip-I, uma classe encontrada exclusivamente em plantas.

Alguns genes podem codificar fatores de transcrição que estão envolvidos na cascata de sinalização, tal como MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), CDPK (*Calcium Dependent Protein Kinases*) enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, como a fosfolipase C, canais de influxo de cálcio, SOS quinases (SHINOZAKI, 2000; XIONG, 2002; ZHANG, 2004).

O estresse hídrico desencadeia a produção de ácido ABA, que por sua vez provoca o fechamento estomático e induz a expressão de genes. Estudos moleculares têm demonstrado a existência de várias moléculas sinalizadoras relacionadas com estresse hídrico, incluindo fatores de transcrição ABA-responsivos (FUJITA et al., 2005). A expressão constitutiva dos fatores de transcrição ABF3 e ABF4, que reconhecem os elementos ABRE na região promotora de determinados genes, aumentou a tolerância à seca em plantas de *A. thaliana*, com expressão alterada de genes de resposta ao ABA como *rd29B*, *rab18*, *ABI1* e *ABI2* (KANG, et al., 2002).

Um aspecto comum a todas as condições de estresse é o aumento da produção de ROS, com o aumento de substâncias e enzimas antioxidantes (ALSCHER et al., 1997) como resultado do desbalanceamento na produção de oxigênio ativado (FOYER et al., 1994). Assim, o sistema de defesa antioxidativo possui um papel fundamental na aquisição de tolerância das plantas (VITÓRIA et al., 2001). Também, as ROS influenciam a expressão gênica e servem como sinal de transdução de algumas vias metabólicas. Dessa maneira, as ROS atuam como indicadores ambientais e sinalizadores biológicos que ativam e controlam vários programas genéticos em resposta ao estresse (GIROTTI, 2001). As plantas ao serem submetidas ao estresse hídrico podem apresentar alterações no transporte de elétrons mediado pelos radicais superóxido formados que competem com o NADP para redução no fotossistema I. Como consequência, pode ocorrer a perda e redução das proteínas D1 e D2 do fotossistema II (REDDY et al., 2004).

Na medida em que o estresse hídrico se torna elevado ocorrem várias alterações, que incluem o aumento na resistência mesofílica à difusão de CO<sub>2</sub>, alterações nas reações fotoquímicas e na atividade das enzimas da fase bioquímica da fotossíntese, bem como das enzimas do metabolismo dos carboidratos e do nitrogênio (FOYER et al., 1994). A falta de água na célula pode ocasionar um aumento da concentração de íons, como Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> promovendo a perda da camada e solvatação de moléculas como as proteínas (BUCHANAN, 2000). Esta camada tem como função estabilizar as proteínas e servir como tampão nas interações com solutos polares. Através da alta concentração desses íons poderá ocorrer a penetração nesta camada de solvatação, interferindo as ligações não covalente que desestabiliza a proteína (SLATER et al., 2003).

Tem sido relatado pela literatura o acúmulo de açúcares solúveis quando a planta está passando por uma deficiência hídrica. Esse fenômeno está associado com a inibição da fotossíntese em várias culturas (LAWLOR; CORNIC, 2002). O acúmulo de carboidratos é muito variável entre as espécies, quando há inibição da fotossíntese, e pode ser regulado pelos níveis dos metabólitos fotossintéticos, e não necessariamente pela ação dos produtos finais (GEIGER, 1987; FOYER et al., 1988).

Em resposta ao estresse, o status dos carboidratos nas folhas é alterado, servindo como sinal metabólico em resposta ao estresse (JANG et al., 1997; CHAVES et al., 2003). Recentes estudos relatam o acúmulo de açúcares simples como, glicose, frutose, tendo como consequência um aumento na atividade da invertase nas folhas (PINHEIRO et al., 2001; TROUVERIE et al., 2003). Trouverie et al. (2003) observaram a correlação direta no aumento da atividade da invertase ácida vacuolar com a concentração de ABA na seiva do xilema.

A atividade da SPS (sintase da sacarose-fosfato) é grandemente reduzida em plantas quando submetidas ao estresse hídrico (LAWLOR; CORNIC, 2002; CHAITANYA et al., 2003), sendo que muitos trabalhos apresentam evidências de que essa redução está associada à diminuição da concentração subestomática de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) (QUICK et al., 1989; LI et al., 2001; AOKI et al., 2003; WIDODO et al., 2003). Com a redução do conteúdo relativo de água ocorre uma redução substancial, se não total, na expansão dos órgãos (LAWLOR; CORNIC, 2002), resultando em limitação no consumo de carboidratos pelos drenos (QUICK et al., 1989). Assim, o acúmulo de carboidratos pode sugerir que a fotossíntese, de forma geral, é menos afetada que a demanda total por assimilados (LAWLOR; CORNIC, 2002), indicando que o acúmulo de açúcares solúveis não resultaria em inibição da fotossíntese. Tal acúmulo de carboidratos também pode ser uma forma de a planta se adaptar às condições hídricas desfavoráveis do solo, por meio de osmoregulação (LAWLOR; CORNIC, 2002), sendo que, nesse caso, o acúmulo de açúcares solúveis geralmente é acompanhado por um aumento na atividade da invertase ácida (PELLESCHI et al., 1997).

Oligossacarídeos tais como rafinose e galactinol são um dos açúcares que podem ser sintetizados em resposta à seca. Estes compostos podem estar atuando como osmoprotetores promovendo assim um ajustamento osmótico na planta (TAJI et al., 2002). Em *Xerophyta viscosa* foram estudadas as alterações

causadas pelo estresse hídrico sobre os carboidratos. Os níveis de sacarose e rafinose aumentaram sob condições elevadas de estresse. O gene *XvGo1S* foi altamente expresso no tecido foliar em condições de estresse hídrico (PETERS et al., 2007).

### 3.1.6 Resposta ao Estresse salino

Salinização é um problema generalizado que afeta 20% da produção agrícola mundial através da prática do cultivo irrigado, além das terras semi-áridas e desérticas (YAMAGUCHI; BLUMWALD, 2005). As concentrações de sais, em geral, restringem o crescimento tanto da parte aérea como do sistema radicular das plantas, em decorrência de efeitos osmóticos, que podem acarretar déficit hídrico, e efeitos específicos de íons, que resultam em toxidez ou desordens nutricionais (MUNNS, 2002). Existem várias plantas de grande importância econômica consideradas glicófitas (espécies que apresentam baixa capacidade de concentração salina), tais como *Oriza sativa*, *Zea mays*, *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris*. A salinização em terras agrícolas deve representar um grande desafio para o futuro, tendo em vista as previsões sobre a mudança e alterações climáticas e o crescimento populacional.

Os principais íons envolvidos na sinalização do estresse salino são  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , pois é através da interação destes íons que ocorre a homeostase celular. As plantas sob condição de salinização limitam a entrada de  $\text{Na}^+$  ou acumulam este íon em seus tecidos mais velhos, formando um ambiente “estoque”, que logo será eliminado (WARWICK; BAILEY, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2004). O íon  $\text{Na}^+$  é considerado potencialmente tóxico para as plantas (KINRAIDE, 1999; BLUMWALD, 2006). A remoção de  $\text{Na}^+$  do citoplasma ou sua compartimentalização no vacúolo é realizada por proteínas antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (APSE et al., 1999), que utilizam as bombas de  $\text{H}^+$  para regular a expressão e atividade dos transportadores de  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  (ZHU et al., 1993). Em baixas condições de salinidade, as plantas mantêm elevadas concentrações de  $\text{K}^+$  e baixas concentrações de  $\text{Na}^+$  no citosol. O  $\text{K}^+$  é elevado em condições normais, pois é um íon móvel, que possui função osmótica, regulando a abertura e fechamento dos estômatos, auxiliando na

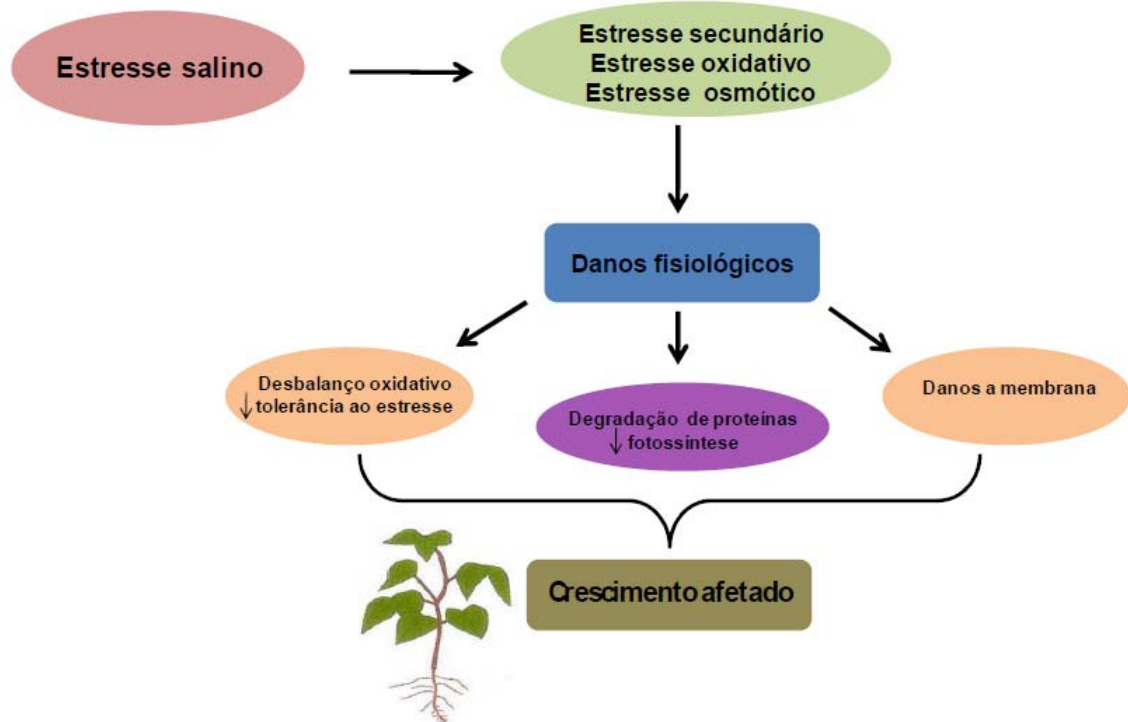
ascensão capilar do  $\text{NO}_3$  – no xilema e atuando na ativação enzimática (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As raízes das plantas é o primeiro local de percepção e de prejuízo provocado pelos vários tipos de estresse, incluindo a salinidade, deficiência nutricional e metais pesados. Em decorrência destas inúmeras circunstâncias, a sensibilidade do estresse na raiz, pode levar a limitação da produtividade da planta (STEPHUN; RANEY, 2005). Uma melhor compreensão das respostas moleculares através do tratamento com NaCl, pode levar ao entendimento e desenvolvimento de cultivares tolerantes a salinidade.

A tolerância ao estresse salino requer uma série de adaptações integradas envolvendo sistemas celulares e metabólicos. Estas adaptações são as respostas para os métodos de análises moleculares avaliarem novos genes ligados a salinidade. A tolerância à salinidade é uma característica multigênica com uma grande quantidade de genes dividida em grupos funcionais diferentes, responsáveis pela minimização dos efeitos do excesso de sal (MUNNS, 2005). Estes genes codificam proteínas fotossintéticas, proteínas ligadas ao transporte para o vacúolo, a síntese de osmólitos e a ativação de protetores contra as espécies reativas de oxigênio.

Os mecanismos de tolerâncias ao estresse salino podem ser simples ou extremamente complexos. O meio simples pode envolver as alterações de algumas vias bioquímicas, por outro lado, os mais complexos envolvem maior proteção do sistema respiratório e fotossintético (Figura 4) (MUNNS, 1993), uso eficiente da água (MUNNS, 2002), manutenção da parede celular (WINICOV, 1998) e cromossomos (BOTELLA et al., 1994).

A alta salinidade pode provocar um estresse hiperosmótico provocando um desequilíbrio iônico que produzem efeitos secundários (KASEGAWA et al., 2000; ZHU et al., 2001).



**Figura 4** – Representação dos danos causados pelo estresse salino em plantas.

A resposta das plantas a esse tipo de estresse desencadeia e altera a expressão de inúmeros genes, levando a mudanças morfológicas, fisiológicas e no metabolismo. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para compreender a sinalização das principais vias de resposta ao estresse salino (ZHU et al., 2002; SEKI et al., 2003; TEIGE et al., 2004). Diversos estudos já foram realizados sobre o efeito da salinidade sobre a fisiologia e o desenvolvimento das plantas, gerando muitas informações para vias de sinalização (ZHU et al., 2003), homeostase iônica (WU et al., 2004) e armazenamento de sódio nas células (BLUMWALD, 2003).

Liu e Zhu (1998) começaram a pesquisar genes que pudessem estar envolvidos na tolerância ao estresse salino e identificaram mutantes de *SOS* (*Salt Overly Sensitive*). Observou-se que através de *SOS* o excesso de sal é eliminado pela da membrana plasmática. Também é relatada na literatura a importância do ABA, do sensor cálcio, como a calcineurina B-like 1 (CBL1) e o envolvimento dos genes *MAPK* e *CDPK* na resposta ao estresse salino (HASEGAWA et al., 2000; XIONG et al., 2002; ALBRECHT et al., 2003; CHEONG et al., 2003; KIM et al., 2004).

Inúmeros trabalhos têm sido realizado com diferentes organismos para caracterizar os componentes e mecanismos das proteínas na raiz submetida a tratamentos com NaCl e outros agentes estressantes (MAJOUL et al., 2000; KAV et al., 2004; REQUEJO; TENA, 2005, YAN et al., 2005; PLOMION et al., 2006; ROTH et al., 2006). Jiang et al. (2007), após aplicar 150 mM de NaCl nas raízes de *A. thaliana*, analisaram as proteínas que estavam sendo diferencialmente expressas, identificando em torno de 100 proteínas candidatas relacionadas com a resposta ao estresse salino, principalmente as envolvidas na resposta a espécies reativas de oxigênio (ROS), transdução de sinais, biossíntese de parede celular, aminoácidos, hormônios e metabolismo de energia (JIANG et al., 2007).

Através do aumento da concentração de compostos orgânicos solúveis, no citoplasma das plantas cultivadas e submetidas ao estresse salino, isto tem sido considerado como um mecanismo utilizado pelas plantas para balancear os potenciais osmóticos, entre o citoplasma e o vacúolo e evitar danos aos sistemas enzimáticos (MUNNS, 2002).

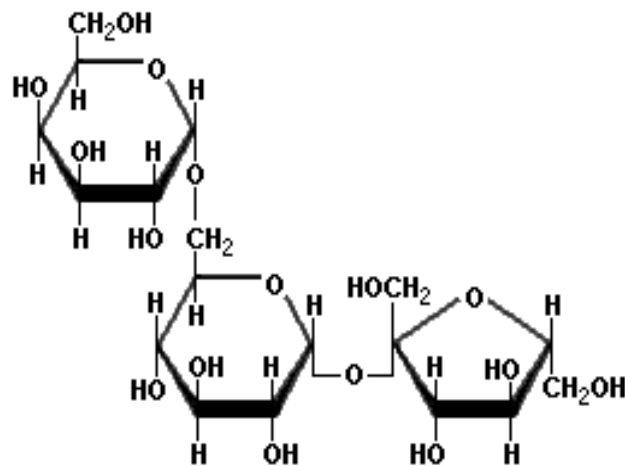
Taji et al. (2002) mostraram que durante o período de estresse osmótico e estresse salino em *A. thaliana* superexpressando o gene *AtGolS2*, foi detectado o alto nível de rafinose e galactinol quando comparado com plantas não transgênicas, sendo ainda observada a indução de dois genes de *galactinol sintase* (*GolS*). As plantas transgênicas foram capazes de tolerar altos níveis de salinidade e estresse hídrico em relação ao controle. Kasuga et al. (1999), descreveram o aumento transcricional dos fatores DREBA/1A e CBF3 em resposta a seca e elevadas concentrações de sacarose, glicose, rafinose, frutose e outros açúcares (GILMOUR et al., 2000). Estes resultados confirmam o papel da rafinose e de outros açúcares como osmoprotetores e osmólitos.

### 3.2 Oligossacarídeos da Família da Rafinose nos Vegetais

A família dos oligossacarídeos da rafinose (RFO) possui múltiplas funções em plantas. A RFO é encontrada nas folhas de várias famílias de plantas superiores (CASTILLO et al.,1990; KUO et al., 1988; LEE et al., 1970), e especialmente em sementes de leguminosas (De LUMEN, 1992; KUO et al., 1997).

Em muitas espécies, a série da rafinose está envolvida no processo de germinação. Muitos autores sugerem que os oligossacarídeos da rafinose, principalmente rafinose e estaquiose, estão relacionados com o processo de tolerância da semente à dessecação (KANDLER; HOPF, 1980; SARAVITZ et al., 1987; LOWELL; KUO, 1989; CASTILLO et al., 1990; STEADMAN et al., 1996; KUO et al., 1988). Além disso, estes galactosil-oligossacarídeos são importantes compostos de proteção contra dessecação e outros agentes ambientais de estresse, promovendo a formação de um estado vítreo que protege macromoléculas (LEOPOLD et al., 1994) ou estabilizando membranas diretamente, através da substituição de moléculas de água entre as extremidades polares dos fosfolipídeos (CROWE et al., 1996).

A rafinose é o segundo açúcar solúvel mais encontrado na natureza (Figura 5), uma vez que o primeiro é a sacarose.



**Figura 5** – Estrutura química da rafinose.

Membros das Curcubitaceae, Scrophulariaceae, Labiatae, Celastraceae e Oleaceae, entre outras famílias, fazem transporte significativo de RFO através do floema (TURGEON et al., 2001 ; ZIMMERMAN; ZIEGLER, 1975).

O papel primário da RFO nos vegetais é o de servir como carboidratos de reserva e para transporte no floema (AYRE et al., 2003). Também servem como crioprotetores (SPRENGER; KELLER, 2000; PENNYCOOKE et al., 2003). Os oligossacarídeos da família da RFO também servem como soluto

compatível para proteção contra estresses abióticos (BACHMANN et al., 1994; HARITATOS et al., 1996). TAJI et al. (2002) relatam que RFO protege a planta quando submetida ao déficit hídrico.

Diversos trabalhos têm demonstrado que os níveis de RFO são positivamente correlacionados com a aclimação das plantas ao frio, sugerindo que os RFOs podem exercer um papel importante na adaptação das plantas ao frio, funcionando como crioprotetores (DEY, 1985; KANDLER; HOPF, 1980; BACHMANN et al., 1994; CASTILLO et al., 1990). Em plantas de *Ajuga reptans* L., submetidas às temperaturas de 10 / 3°C (dia/noite) por um período de 14 dias, foi observado que os níveis de galactinol, sacarose, rafinose e de amido praticamente não foram alterados, enquanto que o nível de estaquiose aumentou rapidamente no início do tratamento e decresceu após 9 dias de exposição, ocorrendo porém um aumento nos níveis de RFO de alto grau de polimerização (BACHMANN et al., 1994). Taji et al (2002) com a finalidade de elucidar o mecanismo de proteção desempenhado pela rafinose em estresse hídrico analisaram plantas transformadas com o gene *AtGo/S2*. Essas plantas apresentaram altos níveis de galactinol e rafinose, exibindo uma melhora à tolerância a seca. Também foi observada a relação entre a expressão do gene *Go/S1* nas folhas de *A. thaliana* e a síntese de RFOs, sugerindo um papel importante deste gene na expressão do estresse induzido pelo calor (PANIKULANGARA et al., 2004).

Castillo et al. (1990), sugerem em seu trabalho que RFOs podem fornecer um microambiente de água e de grupos hidroxílicos ligados que protegem proteínas de membrana e outras moléculas biologicamente ativas da desnaturação durante o processo de dessecação das sementes. O acúmulo de oligossacarídeos da família da rafinose pode ser resultado da conversão dos monossacarídeos, diminuindo assim, a disponibilidade de substrato para a respiração e, conseqüentemente, a atividade metabólica durante a dessecação e armazenamento (LEPRINCE et al., 1992; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Em algumas espécies como nas famílias das Myrothamnaceae, Scrophulariaceae, Lamiaceae, Cyperaceae, Poaceae, Liliaceae e Velloziaceae das provindas das regiões secas da Ásia Central, América do Sul e, sobretudo da África do Sul, chamadas de plantas ressurreição (resurrection plants), o estresse induzido pode levar ao aumento nos níveis de dissacarídeos, trealose e oligossacarídeos da

família da rafinose (FARRANT, 2007), os quais podem estar implicados na estabilização dos fosfolipídios das membranas durante a dessecação.

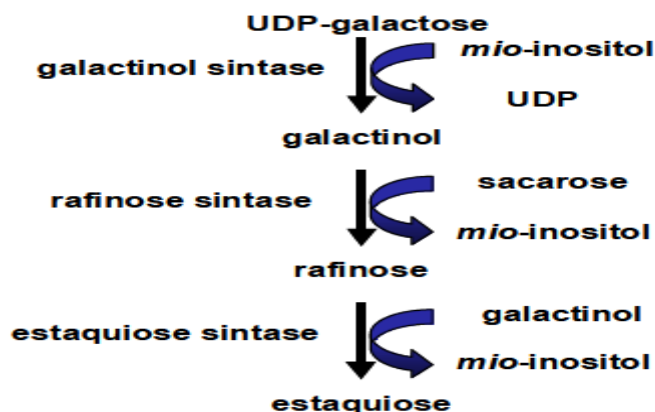
### 3.2.1 Biossíntese de Oligossacarídeos da Família de Rafinose

A biossíntese de rafinose inicia-se a partir da formação de galactinol (*O*- $\alpha$ -Dgalactopiranosil - (1  $\rightarrow$  1) -L-*mio*-inositol) pela enzima galactinol sintase (EC 2.4.1.123 - GoS), catalisando a transferência de UDP-D-galactose para *mio*-inositol (PETERBAUER; RICHTER, 2001).

Em um primeiro momento, ocorre à transferência de uma galactosila para uma molécula de *mio*-inositol, formando o galactinol. Subseqüentemente, o galactinol doa a unidade de galactose para uma molécula de sacarose, formando a rafinose, com a liberação de uma molécula de *mio*-inositol. Os compostos superiores desta via (estaquiase, verbascose e ajugose, respectivamente) são seqüencialmente formados pela ação de galactosiltransferases específicas, a partir da doação da unidade de galactose pelo galactinol.

A Galactinol sintase (GoS) é a enzima-chave que catalisa o primeiro passo na biossíntese dos oligossacarídeos da família da rafinose (RFO), ela pode ser a chave regulatória na divisão do carbono entre a sacarose e a RFO no desenvolvimento das folhas, tendo como função de galactosil transferase.

A via metabólica de síntese de RFO está bem estabelecida, segundo Dey (1985), da seguinte forma:



**Figura 6** - Via da biossíntese de galactinol, rafinose e estaquiase em plantas.

Bachmann et al. (1994) observaram a existência de uma enzima galactinoldependente, que catalisa o alongamento da cadeia através da transferência de galactosila entre duas moléculas de RFO. Mais recentemente, Richter et al. (2000) e Peterbauer e Richter (2001) demonstraram que um grupo de galactosil-ciclitóis, tais como galactosil-ononitol e galactopinitol A, pode substituir o galactinol como doador de galactosila na biossíntese de estaquiose. Estes galactosil-ciclitóis representam derivados metilados do galactinol. No entanto, evidências bioquímicas sugerem que eles sejam sintetizados através da galactosilação galactinol-dependente dos ciclitóis ononitol e pinitol, respectivamente (PETERBAUER et al., 1998; HOCH et al., 1999).

#### 4 EXPRESSÃO DE GALACTINOL SINTASE (GOLS)

Existem vários autores relatando que a expressão dos genes relacionados com a biossíntese e acumulação intracelular de galactinol e rafinose está associada a respostas de estresse ambientais (TAJI et al., 2002; KAPLAN et al., 2004; PANIKULANGARA et al., 2004; PETERS et al., 2007).

Liu et al. (1998) identificaram transcritos de *Go/S* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), sendo mais expresso em tecidos vegetativos quando expostos a baixas temperaturas. Downie et al. (2003) clonaram o gene *Go/S* em tomate (*Solanum lycopersicum* Mill. cv Moneymaker) denominado *LeGo/S1* e caracterizaram a sua expressão durante a maturação das sementes e durante a germinação sob várias condições.

Através da análise do genoma de *Arabidopsis thaliana* foram identificados e caracterizados sete genes relacionados a *Go/S* (TAJI et al., 2002). Este estudo demonstrou que plantas de *A. thaliana* submetidas às condições adversas como déficit hídrico, salinidade ou frio, acumulam uma grande quantidade de galactinol e rafinose, mas não de estaquiase. Não foram detectados galactinol e rafinose em plantas não estressadas. Isto sugere que rafinose e galactinol estão envolvidos na tolerância ao estresse salino, déficit hídrico e baixas temperaturas (TAJI et al., 2002). Ainda, estes autores identificaram três genes de *Go/S* envolvidos em resposta ao estresse em *A. thaliana*, denominados *AtGo/S1*, 2 e 3. Os genes *AtGo/S1* e 2 foram induzidos em condições de estresse hídrico e salino, enquanto que o *AtGo/S3* foi induzido em baixas temperaturas. Os resultados obtidos demonstram que a *Go/S* está envolvida na acumulação de galactinol e rafinose sob condições de estresse abiótico, que por sua vez atuam como osmoprotetores em plantas submetidas ao estresse hídrico.

Em *Cucumis melo* foi verificado que o gene *galactinol sintase CmGo/S1* ativa o metabolismo de RFO nas plantas sob condição de estresse hídrico, sendo que a ocorrência da expressão desse gene se dá em folhas e sementes (VOLK et al., 2003). O transcrito da isoforma *CmGo/S1* está presente durante o desenvolvimento das sementes, resultando na formação de rafinose e estaquiase.

A planta *Ajuga reptans* tem servido como modelo para estudar a regulação e a importância do metabolismo de RFO (SPRENGER et al., 2000). Foram identificados e isolados dois cDNAs que codificam dois genes de *GoIS* distintos, designados *GoIS1* e *GoIS2*, respectivamente. Sprenger et al. (2000) sugeriram que a isoforma de maior expressão (*GoIS1*) está envolvida principalmente na síntese de RFO atuando como carboidrato de reserva e a de menor expressão (*GoIS2*) atua na síntese e no transporte de transporte da RFO.

Em milho (*Zea mays* L. inbred line B-73) foram identificados três cDNAs, sendo que as proteínas recombinantes desses cDNAs sintetizaram galactinol em sistema heterólogo (ZHAO et al., 2004). O mRNA de *ZmGoIS1* não foi detectado em nenhum dos tecidos estudados, porém a isoforma *ZmGoIS3* é predominantemente expressa durante o desenvolvimento de sementes enquanto que o *ZmGoIS2* é expresso na ocorrência de algum tipo de estresse ambiental (ZHAO et al., 2004). No trabalho de Stolf (2005), identificou-se a expressão do gene *GmGoIS* em folhas de soja submetidas a déficit hídrico, sugerindo o envolvimento deste gene na resposta à seca.

No trabalho de Peters et al. (2007), foi identificado um gene relacionado a *galactinol sintase*, denominado *XvGoIS*, em uma biblioteca de cDNA construída a partir de folhas de *Xerophyta viscosa*. Foi demonstrado que em plantas sob déficit hídrico com índice abaixo de 5% de conteúdo relativo de água - RWC (Relative Water Content), a sacarose e a rafinose são os carboidratos predominantes.

A expressão do gene *GoIS1* e *GoIS2* em *A. thaliana* é regulada pelos fatores de transcrição Heat Shock - HsfA1a, HsfA1b e HsfA2 (PANIKULANGARA et al., 2004; BUSCH et al., 2005; SCHRAMN et al., 2006). Em plantas de *A. thaliana* através da expressão do gene *GoIS1*, foi verificado o aumento nos níveis de galactinol e rafinose após duas horas de submissão ao estresse térmico (PANIKULANGARA et al., 2004).

Nishizawa et al. (2006) observaram que a transcrição do gene *GoIS1* e *GoIS2* é induzida por estresse causado por alta incidência de luz, por estresse térmico e que o tratamento com peróxido de hidrogênio ativa o fator HsfA2. Estes dados indicam que o acúmulo de galactinol e rafinose também está relacionado com a proteção das células vegetais aos danos advindos da produção de ROS causado pelos diferentes tipos de estresse.

Estudos relacionados ao transporte de RFO em *Cucumis blumei* demonstraram que galactinol é transferido para o apoplasto e possui transporte limitado para o floema, enquanto que sacarose, rafinose e, particularmente, a estaquiose são efetivamente retidos no simplasto e posteriormente transportados (AYRE et al., 2003). Para observar o mecanismo de percurso da RFO dentro das células especializadas no fluxo do floema em *Verbascum phoeniceum* L., mediada pela atividade de galactinol, foram clonados dois genes (*VpGAS1* e *VpGAS2*). O silenciamento de ambos os genes por RNAi resultou em uma acentuada inibição da síntese de RFO, afetando de forma negativa o transporte de floema (TURGEON; McCASKILL, 2007).

Embora ocorram evidências sobre a correlação entre a atividade de Galactinol sintase e o conteúdo de RFO presente nos órgãos das plantas, o aumento da expressão do gene *GoIS* sugere que existam fatores alternativos que possam modular o acúmulo de RFO. Karner et al. (2004) demonstraram que além da atividade de *GoIS* a concentração inicial dos substratos de *mio*-inositol e sacarose também podem controlar a acumulação de RFO em sementes.

Takanashi et al. (2008) trabalharam com plantas de *Coptis japonica*, onde foi identificado apenas um cDNA codificando *galactinol sintase* (*CjGoIS*), a qual foi identificada como responsável por conferir tolerância à berberina produzida pela própria planta. Análises semi-quantitativas através de RT-PCR demonstraram que o gene foi expresso em toda planta, porém ocorrendo uma maior expressão na parte aérea, pecíolos e folhas.

Plantas de tabaco transformadas superexpressando constitutivamente o gene *CsGoIS* de *Corynespora cassiicola* aumentaram a quantidade de galactinol em raízes e apresentaram resistência contra os patógenos *Botrytis cinerea* e *Erwinia carotovora*. Tanto as plantas de tabaco transformadas como as plantas controle tratadas com galactinol em aplicação exógena também demonstraram um aumento na tolerância a seca e ao estresse salino (KIM et al., 2008)

## 5 ARTIGO

5.1 EXPRESSÃO DE TRÊS ISOFORMAS DE *GALACTINOL SINTASE* EM PLANTAS DE *COFFEA ARABICA* L. SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS.

Artigo a ser submetido à Revista Plant Science- Elsevier

## EXPRESSÃO DE TRÊS ISOFORMAS DE GALACTINOL SINTASE EM PLANTAS DE *COFFEA ARABICA* L. SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS.

Tiago Benedito dos Santos<sup>1,2</sup>, Celso Jamil Marur<sup>1,2</sup>, Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz<sup>3</sup>, Luiz Filipe Protásio Pereira<sup>4</sup>, Luiz Gonzaga Esteves Vieira<sup>5</sup>

### Abstract

Plants are exposed to different abiotic stress such as drought, salinity, high temperature and cold. Abiotic stress also induces various molecular, biochemical and physiological responses in plants. Galactinol synthase (GoS) is a key enzyme in the raffinose and stachyose biosynthetic pathway (RFOs family). This protein functions as a galactosyl transferase, which catalyses the key regulatory reaction using UDPgalactose and *myo*-inositol as substrates to form galactinol and UDP. *GoS* genes have often been identified as stress responsive genes in many plant species. To study the function of different isoforms of *Coffea arabica* *GoS* in response to drought, salinity and heat stresses, we characterized the transcriptional expression of three *Galactinol synthase* isoforms: *CaGoS1*, *CaGoS2*, *CaGoS3* in different tissues and quantify raffinose, galactinol and stachyose in leaves. The differential pattern of transcripts accumulation observed in coffee leaves shows that isoforms of *GoS* have a functional specialization in abiotic-triggered galactosyl oligosaccharids synthesis. *CaGoS1* isoform was constitutively expressed in plants under normal irrigation and was the most responsive during all abiotic stress treatments. Transcripts of *CaGoS2* were also detected only in leaves but under conditions of severe stress, whereas the expression of *CaGoS3* was observed under both moderate and severe stress, and also during plant recovery. The expression of *CaGoS1* isoform was observed on the leaves of plants under normal growth conditions and also throughout the period of stress. On the other hand, the *CaGoS2* isoform was expressed only during salt stress conditions. The transcriptional level of *CaGoS3* was detected at lower rates than the previous isoforms. In heat stress *CaGoS1* isoform presented an increased transcriptional activity on the third day of heat stress, decreasing on the fifth day of heat stress. The expression of isoform *CaGoS2* was barely during the periods of stress tested. Regarding *CaGoS3*, the presence of this isoform was detected only during the third day of stress in leaves. The high *GoS* transcription did not reflect into the amount of galactinol, as specific glycosyltransferases most likely used galactinol to transfer galactose units to higher homologues oligosaccharides, as suggested by the increase of raffinose and stachyose during the abiotic stresses.

**Keywords:** Coffee. Abiotic stress. Galactinol synthase.

---

<sup>1</sup> Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR, LBI-AMG, CEP 481, 86001-970 Londrina, PR, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina – UEL, CEP 86051-990 Londrina, PR, Brasil

<sup>3</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Café, CEP 481,86047-902 Londrina, PR, Brasil

<sup>4</sup> Universidade Federal do Paraná – UFPR, Depto de Bioquímica e Biologia Molecular, CEP 80.060-000 Curitiba, PR, Brasil

### 5.1.1 Introdução

Os estresses abióticos como seca, salinidade, altas e baixas temperaturas desencadeiam uma série de respostas nas plantas, começando com a percepção levando a ativação de rotas de sinalização, e alterando os níveis de expressão gênica, conseqüentemente alterando toda a fisiologia, crescimento e desenvolvimento da planta. Essas modificações nos ambientes podem levar a grandes alterações no metabolismo de carboidratos (KAUR et al., 2000).

A família dos oligossacarídeos da rafinose (RFO) são derivados de  $\alpha$ - galactosil e sacarose, sendo que rafinose, estaquiase e verbasquiase são considerados componentes de reserva para as sementes. A rafinose pode desempenhar um papel importante na tolerância contra dessecação da semente durante sua maturação. Joet et al. (2009) tentaram reconstruir as vias metabólicas envolvidas na biossíntese dos principais compostos de armazenamento em sementes de café. Foram observadas quantidades substanciais de galactinol no perisperma, sendo que rafinose e estaquiase são acumulados por pouco tempo no endosperma.

O papel das RFOs na proteção das plantas contra o estresse hídrico é relatado por Taji et al. (2002). Plantas de *Arabidopsis thaliana* submetidas ao estresse hídrico, salino e frio acumularam grandes quantidades de rafinose e galactinol, porém esse acúmulo não foi verificado em plantas controle, sugerindo que esses carboidratos estão envolvidos na tolerância contra o estresse (TAJI et al., 2002).

Galactinol sintase (GoS) (EC 2.4.1.123 - GOLS) é a enzima que catalisa o primeiro passo na biossíntese dos oligossacarídeos da família das RFOs e desempenha um papel regulador importante na partição do carbono entre sacarose e RFO. No genoma de *A. thaliana* foram identificados sete genes relacionados a GoS, dentre esses, três isoformas foram caracterizadas em resposta a estresse abiótico, denominados *AtGoS1*, 2 e 3. Os genes *AtGoS1* e 2 foram induzidos em condições de estresse hídrico e salino, enquanto que o *AtGoS3* foi induzido em baixas temperaturas. Os resultados obtidos demonstram que a GoS está envolvida na acumulação de galactinol e rafinose sob condições de estresse abiótico, que por sua vez atuam como osmoprotetores em plantas submetidas ao estresse hídrico (TAJI et al., 2002). Nas folhas de tomate e de *A. thaliana* foi observado aumento

transcricional de *GoIS* e de *rafinose sintase (RS)* quando submetidas a estresses ambientais, como frio e dessecação (DOWNIE et al., 2003; ZUTHER et al., 2004).

A expressão do gene *GoIS1* e *GoIS2* em *A. thaliana* é regulada pelos fatores de transcrição Heat Shock - HsfA1a, HsfA1b e HsfA2 (PANIKULANGARA et al., 2004; BUSCH et al., 2005; SCHRAMN et al., 2006). Em plantas de *A. thaliana* através da expressão do gene *AtGoIS1*, foi verificado o aumento nos níveis de galactinol e rafinose pouco tempo após a submissão das plantas ao estresse térmico. Acredita-se que HSFs podem estar envolvidos na seca e salinidade desencadeando a expressão dos genes *AtGoIS1/AtGoIS2*. Já a expressão do gene *AtGoIS3*, induzida por baixas temperaturas, é regulada pelos fatores DREB1/CBF (PANIKULANGARA et al., 2004).

Em milho (*Zea mays* L. inbred line B-73) foram identificados três cDNAs em banco de dados, tendo a proteína recombinante desses cDNAs sintetizado galactinol. O gene *ZmGoIS1* não foi detectado em alguns dos tecidos estudados, porém *ZmGoIS3* é predominantemente expresso durante o desenvolvimento de sementes e o *ZmGoIS2* é expresso quando ocorre algum tipo de estresse (ZHAO et al., 2004).

Nishizawa et al. (2006) observaram que a transcrição do gene *GoIS1* e *GoIS2* em *A. thaliana* é induzida por estresse causado por alta incidência de luz e estresse, e que o tratamento com peróxido de hidrogênio ativa o fator HsfA2. Estes dados indicam que o acúmulo de galactinol e rafinose também está relacionado com a proteção das células vegetais aos danos advindos da produção de ROS causado pelos diferentes tipos de estresse.

Para estudar o mecanismo de percurso da RFO dentro das células especializadas no fluxo do floema em *Verbascum phoeniceum* L., mediada pela atividade de galactinol, foram clonados dois genes (*VpGAS1* e *VpGAS2*). O silenciamento de ambos os genes por RNAi resultou em uma acentuada inibição da síntese de RFO, afetando de forma negativa o transporte de floema (TURGEON; McCASKILL, 2007).

Além da já bem estudada relação das RFOs com as respostas das plantas aos estresses abióticos, recentes estudos mostraram que plantas transformadas expressando o gene *CsGoIS* de *Corynespora cassiicola* aumentaram os níveis de galactinol nas raízes apresentando mecanismo de resistência contra os patógenos *Botrytis cinerea* e *Erwinia carotovora* (KIM et al., 2008).

O déficit hídrico e as baixas temperaturas é um dos fatores ambientais mais importantes para a diminuição da produtividade do cafeeiro, tanto para o Brasil como também para outros países produtores. O entendimento de como as plantas de cafeeiro respondem aos estresses ambientais é fundamental para a sustentabilidade deste sistema agrícola. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar cDNAs (*CaGo/S1*, *CaGo/S2* e *CaGo/S3*) que codificam a enzima Galactinol sintase (GoS) no banco de dados do Projeto Genoma Café e estudar a sua expressão transcricional em folhas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 submetidos a diferentes tipos de estresse abióticos. Como o nível transcricional nem sempre é relacionado com a quantidade final do metabólito correspondente produzido pela enzima envolvida em sua via metabólica, os oligossacarídeos derivados da via biossintética do galactinol foram também quantificados em plantas cultivadas sob condições normais de desenvolvimento e sob condições de estresse.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Busca pelo Gene *Galactinol Sintase (GoS)*

Inicialmente foram realizadas buscas a partir de palavra-chave dentro do banco de dados do Genoma Café ([www.lge.ibi.unicamp.br/café/](http://www.lge.ibi.unicamp.br/café/)) para o gene *galactinol sintase (GoS)*. Nesse banco de dados estão disponibilizados 200.000 clones de ESTs obtidos de quarenta e quatro bibliotecas de cDNA, principalmente de *C. arabica*. O cDNA foi obtido a partir de diferentes tecidos do cafeeiro (folhas, raízes, flores, sementes, frutos, entre outros) em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas a diversas condições de estresse (VIEIRA et al., 2006). As sequências obtidas (91 reads) foram alinhadas pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994). Para uma maior confiabilidade nas análises de caracterização as sequências foram analisadas utilizando outras plataformas como Sequencher v. 4.1.4 (Gene Codes Corporation, 1998) e BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.9.0 (HALL, 1999).

As sequências foram confrontadas com outras sequências depositadas no banco de dados do GenBank, utilizando os programas BlastP e BlastX (National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para confirmar a identidade das mesmas (ALTSCHUL et al., 1997). A sequência

deduzida de aminoácidos de cada *contig* formado foi obtida através do programa ORF Finder (Open Reading Frame Finder - NCBI).

As árvores filogenéticas foram geradas através do programa CLC Main Workbench 4.0, através do algoritmo UPGMA. Para testar a confiabilidade da análise foram utilizadas 1.000 réplicas de *bootstrap*. Também foram realizadas buscas por sequências de *galactinol sintase* na plataforma HarvEST:Coffea v. 0.10 (<http://harvest.ucr.edu/>). O banco de dados utilizado pelo HarvEST:Coffea possui principalmente seqüências de *C. canephora* (45.641) distribuídas em 12 bibliotecas.

Para obtenção das sondas para análise de expressão das isoformas CaGoS1, CaGoS2 e CaGoS3 foram utilizados clones oriundos das bibliotecas de cDNA do Projeto Genoma Café armazenados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). O critério de seleção para a escolha dos clones foi baseado no alinhamento e na formação dos respectivos *contigs* dentro da plataforma do Projeto Genoma Café, o que tornou possível escolher os que apresentavam a maior região 5'UTR.

## 5.2.2 Experimento de Estresse hídrico

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Foram utilizadas cinco plantas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 com a mesma idade e tamanho similar (um ano e oito meses e cerca de 70 centímetros de altura), sendo submetidas a um período sem adição de água em vasos com aproximadamente 25 Kg de substrato (3 terra: 1 areia: 1 composto orgânico). Todos os vasos foram expostos em posição semelhantes em relação à incidência da luz solar. As coletas dos materiais para análise foram realizadas conforme as leituras do potencial hídrico, sendo subdividas em: sem estresse ( $\pm$  - 1.34 MPa), estresse moderado ( $\pm$  - 2.39 MPa), estresse severo ( $\pm$  - 4.5 MPa) e recuperado (material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo). Para cada dia de análise foram feitas coletas de folhas (*pools* de dois pares de folhas dos cinco vasos sob as mesmas condições). As folhas coletadas foram imersas imediatamente em N líquido e armazenada em freezer – 80°C até o momento de análise.

O potencial de água na folha foi monitorado através de psicrômetros de termopar (modelo C-30, Wescor, Inc., Logan, Ut, U.S.A) acoplados a um

datalogger (Campbell Scientific, Inc., Logan, Ut, U.S.A., modelo CR-7). A cada dia de leitura, entre 9h30min e 10h, uma amostra de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> da folha coletada da parte mediana de ramo plagiotrópico posicionado no meio da planta (folha totalmente madura e sem sinais danos ou deficiências), de cada planta foi coletada e colocada nos psicrômetros. O datalogger foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até o equilíbrio da pressão de vapor na câmara. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio. Após a obtenção do potencial total da água ( $\Psi_t$ ), os sensores foram imersos durante 4 min em nitrogênio líquido e as leituras retomadas para obtenção do potencial osmótico ( $\Psi_s$ ). O cálculo do potencial de pressão foi realizado através de  $\Psi_t - \Psi_s$ . A coleta das plantas para a realização dos pools foi baseada no potencial hídrico em função dos níveis de estresse estabelecidos, realizado através do monitoramento do potencial hídrico de cada planta por psicrometria.

### 5.2.3 Experimento de Estresse térmico

Esse experimento foi realizado em câmara de crescimento (FITOTRON) no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Foram utilizadas cinco plantas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 com a mesma idade e tamanho similar (um ano e dez meses e cerca de 70 cm de altura), sendo mantidas em vasos com aproximadamente 25 Kg de substrato (3 terra: 1 areia: 1 composto orgânico).

Primeiramente, as plantas foram aclimatadas na câmara durante sete dias em uma temperatura de 24°C e fotoperíodo controlado (12h:12h). Após esse período, deu-se o início dos tratamentos com a elevação da temperatura para 37°C durante cinco dias com manutenção de irrigação diária. Foram estipulados três pontos de coleta para o experimento de estresse térmico: Dia 0 - folhas coletadas um dia antes do início do tratamento em plantas mantidas a 24°C, Dia 3 e Dia 5 – folhas coletadas três e cinco dias após o início do tratamento térmico, respectivamente. As folhas, foram coletadas no mesmo estágio de desenvolvimento (segundo par de folhas de cada ramo plagiotrópico) e imediatamente imersas em N líquido e mantidas em freezer - 80°C. A cada coleta foi feito um *pool* de folhas (mistura de dois pares de folhas dos cinco vasos do experimento, sob as mesmas condições de estresse). Foram realizadas medições das trocas gasosas nas plantas

utilizando o sistema portátil de fotossíntese, (Li6200-Licor, Licon, NE, EUA), com câmara de 1 litro, para a obtenção dos valores da taxa fotossintética após o início do estresse térmico.

#### 5.2.4 Experimento de Estresse salino

O experimento de estresse salino também foi conduzido em casa de vegetação no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). Foram selecionadas vinte plantas de *C. arabica* cv. IAPAR-59, com idade aproximada de seis meses, todas cultivadas em vasos contendo 1,5 Kg de substrato. Para evitar choque osmótico, as plantas foram irrigadas no primeiro dia com 50 mM de NaCl, e no segundo dia 100 mM. A partir do terceiro dia até o final do experimento as plantas foram irrigadas diariamente com 150 mM de NaCl. Folhas de mesmo par foram coletadas de cada planta antes de iniciar o tratamento (controle sem adição de NaCl - dia 0) e 6, 12 e 25 dias após o início do tratamento com NaCl 150 mM, e imediatamente submergidas em N líquido (para evitar qualquer tipo de oxidação do material).

#### 5.2.5 Extração de RNA total

Foram realizadas as extrações de RNA total de diferentes tecidos do cafeeiro (raiz, ramo, botão floral, flor, fruto e folha) de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 para os experimentos de estresse abiótico descritos anteriormente. O material vegetal foi coletado e armazenado a -80°C até a sua utilização.

As extrações foram conduzidas usando o tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM de TRIS-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl, 0,5g/L-1, 2% de  $\beta$ - mercaptoetanol e 2% metabissulfito de sódio) de acordo com o protocolo de Chang et al (1993). Todo material de manipulação foi esterilizado a seco overnight (180°), para evitar a ação de RNAses e possível degradação dos ácidos nucléicos e proteínas. Foram usados de 2 a 3 g do material macerado em nitrogênio líquido, adicionados 25 mL de tampão de extração (2% (p/v) CTAB, 2% (p/v) PVP, 100 mM de TRIS-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl, 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 2% (p/v) metabissulfito de sódio).Após incubação a 65°C por 20 min, foi adicionado cerca de 20 mL de clorofórmio e, em seguida a solução foi centrifugada (7.500 rpm) por 5 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo

tubo onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, seguido de homogeneização conforme descrito acima, sendo esse procedimento repetido quando necessário. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, foi adicionado LiCl<sub>2</sub> 12 M para uma concentração final de 2,5 M para precipitação *overnight* a 5 °C. Após a precipitação o material foi centrifugado durante 30 min (7.500 rpm) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com LiCl<sub>2</sub> 2,5 M, seguido de nova centrifugação. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspensso em 1 mL de álcool 70% (v/v) e transferido para microtubos para centrifugação (11.000 rpm) por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensso em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC (dietil pirocarbonato).

Após a extração de RNA foi verificado a integridade das amostras, através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), com tampão TAE (2M Tris – acetato, 0,05 M EDTA), contendo brometo de etídio (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) e visualizados sob luz UV em transluminador. A quantificação do RNA foi feita baseada no Fluorímetro Qubit<sup>TM</sup> (Invitrogen).

#### 5.2.6 Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento dos cDNAs das isoformas de *Go/S*, sendo utilizado 1 µL de DNA, 6pmol do oligonucleotídeo específico para cada clone e M13, senso ou anti-senso, 4 µL de “DYEnamic ET reagent premix” (contendo dNTP associados às substâncias fluorescentes e Thermo Sequenase<sup>TM</sup> II DNA polimerase) e água MilliQ autoclavada para um volume final de 10 uL. A reação de seqüenciamento foi feita em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) com duração de 30 ciclos usando os parâmetros: 95 °C por 20 min, 50° C por 15 min e 60°C por 60 min.

Após a reação, adicionou-se às amostras 1 uL de acetato de amônio 7,5 M, 27,5 uL de etanol 100%, e a placa foi invertida e centrifugada 4000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado lavado com 145 uL de etanol 70%. Centrifugou-se por mais 10 min a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram colocadas em estufa a 37°C durante 5 min para a completa evaporação do álcool. Para o seqüenciamento, as amostras foram ressuspensas em 10 uL de água MilliQ autoclavada. O seqüenciamento foi realizado em equipamento 3130xl Genetic analyzer (Applied Biosystems).

### 5.2.7 Dot Blot

Para verificar a especificidade das sequências utilizadas como sondas para cada isoforma, foram confeccionadas membranas contendo amostras de DNA referentes aos três clones nas concentrações de 100 pg, 500 pg e 1000 pg. Em poços de placa de 96 amostras foram adicionados 50 µL de NaOH 0.4M + EDTA 10mM e as diferentes alíquotas de DNA plasmidial referente a cada clone. Para desnaturação a placa permaneceu a 100°C por 10 min, em seguida neutralizada adicionado-se 50 µL de acetato de amônio 2M pH 7,0 gelado. O volume total foi transferido para o aparelho de Dot Blot (Bio-Dot® - Bio-Rad). Após isto, adicionouse 500 µL de NaOH 0,4 M por poço e novamente foi aplicado vácuo até filtração completa. Posteriormente, o aparato de Dot blot foi desmontado, a membrana lavada com SSC 2X (3M NaCl, 0.3 mM citrato de sódio) e deixada a 80°C por 2 h para a fixação do DNA. As membranas foram pré hibridizadas por 2 h com solução UltraHyb (Ambion) e hibridizadas com sonda marcada com  $\alpha$ P32 dCTP usando a técnica de oligonucleotídeos aleatórios (*random priming*), por 24 h a 37°C. Após hibridização as membranas foram lavadas 2X durante 20 min com o tampão 1 (SSC 1%; SDS 0,1%) e com tampão 2 (SSC 1%; SDS 0,1%), seladas em plástico e expostas em placa de imagem BAS-IP MS 2340. As imagens foram capturadas utilizando aparelho fluorescent image analyzer FLA 3000 – series (Fuji Photo Film CO, Lts. Tokyo – Japan).

### 5.2.8 Northern Blot

Para determinar a expressão de cada isoforma do gene *galactinol sintase*, foi utilizada a técnica de Northern Blot (ALWINE; KEMP; STARK, 1977). Foram utilizados 15 µg de RNA total, para análise. Após extração, foi adicionado 0,5x o volume das amostras de RNA total de tampão de corrida (SIGMA– R4268) e as amostras foram desnaturadas a 65°C por 10 min, seguindo de 10 min em gelo antes da aplicação no gel. As amostras foram separadas por eletroforese em gel desnaturante com 1,4 % agarose em 1X MOPS contendo 5% de formaldeído. Após a corrida o gel foi lavado com água deionizada estéril por 10 min e com SSC 10X por 10 min, em mesa agitadora. O RNA foi transferido do gel para membrana de nylon XL Hybond (Amersham Biosciences) por capilaridade utilizando 10X SSC como

tampão *overnight*. Em seguida, a membrana foi exposta a 80°C por duas horas para *crosslink*. A membrana foi hibridizada *overnight* a 42°C em tampão AMBION®. As sondas utilizadas foram marcadas com radioisótopos  $\alpha$ -dCTP32 através da técnica de oligonucleotídeos aleatórios (*random primer*).

## 6 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS

### 6.1 EXTRAÇÃO E ANÁLISE CARBOIDRATOS

As folhas coletadas dos experimentos de estresse hídrico, salino e térmico foram maceradas em N líquido no Laboratório de Biotecnologia (IAPAR) e as análises foram realizadas em parceria com o laboratório do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As folhas foram liofilizadas e submetidas ao processo de extração descrito por Albini et al. (1994) para obtenção dos oligossacarídeos de baixa massa molecular.

As análises foram feitas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) utilizando um equipamento Shimadzu (Japão) equipado com unidade de controle CBM-10A, forno CTO-10A, bomba LC-10AD e detector de índice de refração RID- 10A. Utilizou-se uma coluna Supelcogel Ca (Supelco- USA), 30 cm x 7,8mm e précoluna Supelcogel Ca, 5cm x 4,6mm. A temperatura de análise foi de 80°C, fluxo de 0,5 mL/min e água foi o eluente. Foram feitas curvas de calibrações para os padrões de carboidratos (galactinol, rafinose e estaquiose) as quais foram utilizadas para quantificação absoluta dos carboidratos nas amostras.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE *GALACTINOL SINTASE*

A análise *in silico* compreendeu o processo de mineração dentro do banco de dados do Projeto Genoma Café ([www.lge.ibi.unicamp.br./café/](http://www.lge.ibi.unicamp.br./café/)), no qual foram coletadas as possíveis sequências (*reads*) envolvidas na síntese de galactinol sintase.

A busca pelas sequências foi realizada através de palavra-chave do gene *galactinol sintase* dentro da plataforma de dados do Genoma Café. Foram obtidas 91 seqüências provindas de diferentes bibliotecas depositadas no banco. Essas sequências foram selecionadas e passaram por uma série de análises e saturação, com a finalidade em conseguir o maior número de *reads*. Obteve-se a partir desses *reads* clusterizados (agrupadas por similaridade) 11 *contigs* e 3 singletons, sendo que nem todos os *contigs* formados eram *full-length*. Para garantir uma maior confiabilidade da formação dos *contigs*, essas sequências foram reclusterizadas e analisadas pelos programas Sequencher v. 4.1.4 (Gene Codes Corporation, 1998) e BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.9.0 (HALL, 1999).

Dentre os 11 *contigs*, apenas 3 foram escolhidos para serem utilizados neste trabalho por possuir sequências provenientes, na quase totalidade, de bibliotecas de folhas, apresentaram um número maior de *reads* e eram *full-length*, sendo então denominados *CaGoS1*, *CaGoS2* e *CaGoS3* (Tabela 1).

**Tabela 1** – Seqüências dos genes *galactinol sintase* identificados no Genoma Café

| CONTIGS       | Nº READS | BIBLIOTECAS                                      |
|---------------|----------|--|
| <i>CaGoS1</i> | 49       | AR1, BP1, IA2, LV4, LV5, LV8, LV9, PC1, RM1, SH2 |
| <i>CaGoS2</i> | 6        | AR1, LV5, SH2                                    |
| <i>CaGoS3</i> | 10       | FR2, LV4, LV5, LV9, SH2                          |

**Bibliotecas:** AR1= folhas tratadas com ácido araquidônico; BP1= células suspensão, raiz e folha com bion; FR2= botão floral estágio 1 e 2 – curta; IA2= linhagem embriogênica (folha *C. arabica*) com indução por 2,4 D\*; LV4= folhas ponteiro ramo ortotrópico sem bion - longa; LV5= folhas ponteiro ramo ortotrópico sem bion – curta; LV8= folhas ramo plagiotrópico sem bion – longa (plantas adultas); LV9= folhas ramo plagiotrópico sem bion – curta (plantas adultas); PC1=calo não embriogênico com indução de 2,4D\*; RM1= folha infestada com bicho mineiro e infectada com ferrugem; RT3= raiz; SH2= estresse hídrico campo (pool de órgãos e tecidos).

Para certificar que os *contigs* demonstravam similaridade com o gene *galactinol sintase* de outros organismos, cada *contig* teve sua seqüência de nucleotídeo confrontada com as seqüências do NCBI utilizando-se os algoritmos

BlastX e BlastP (ALTSHUL et al., 1990). A seqüência deduzida de aminoácidos de cada *contig* formado foi obtida através do programa ORF Finder (Open Reading Frame Finder - NCBI).

As três isoformas de *Go/S* apresentam domínio para família de glicosiltransferase 8. A presença do domínio de glicosiltransferase é uma característica da família das RFOs sintases, incluindo a *Go/S*.

## 7.2 CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO CDNA DE TRÊS ISOFORMAS DE *GALACTINOL SINTASE* EM *COFFEA ARABICA* L.

A isoforma *CaGo/S1* possui 1402 pb (pares de bases) e uma seqüência deduzida de aminoácidos de (338 aa). Quando realizado BlastX, esta isoforma apresentou maior similaridade com *Coptis japonica*, *Ajuga reptans*, *Verbascum phoeniceum* e *Arabidopsis thaliana* (Tabela 2).

**Tabela 2** – Organismos que apresentaram maior similaridade com genes *galactinol sintase* identificados no Genoma Café

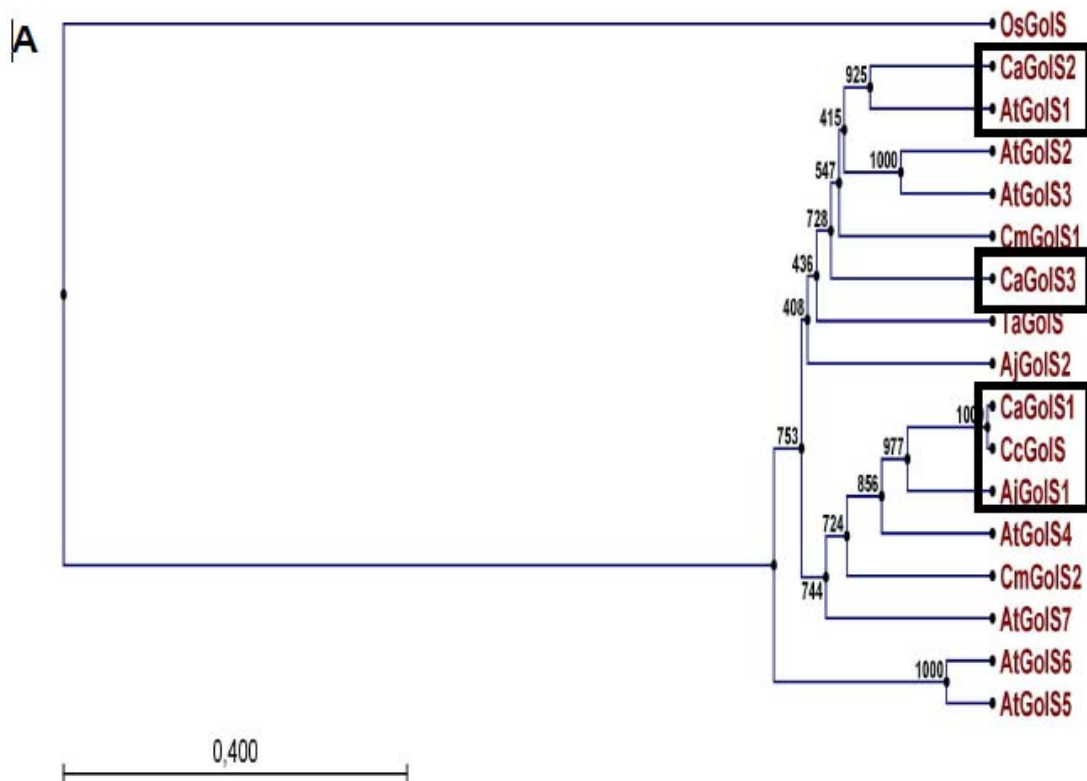
| Isoformas      | Organismos                              | Identidade | Similaridade | E-value |
|----------------|---|------------|--------------|---------|
| <i>CaGo/S1</i> | <i>Coptis japonica</i> - BAF99254       | 82%        | 91%          | 1e-167  |
|                | <i>Ajuga reptans</i> - CAB51533         | 83%        | 90%          | 2e-166  |
|                | <i>Verbascum phoeniceum</i> - ABQ12640  | 83%        | 90%          | 7e-161  |
|                | <i>Arabidopsis thaliana</i> - NP_176250 | 82%        | 92%          | 2e-156  |
| <i>CaGo/S2</i> | <i>Capsicum annuum</i> – ABQ44212       | 74%        | 84%          | 3e-140  |
|                | <i>Brassica napus</i> - ACJ15472.1      | 79%        | 88%          | 1e-147  |
|                | <i>Arabidopsis thaliana</i> - BAB78530  | 75%        | 84%          | 2e-147  |
|                | <i>Xerophyta viscosa</i> - ABK27907     | 74%        | 83%          | 2e-144  |
| <i>CaGo/S3</i> | <i>Cucumis sativus</i> - AAO84915       | 80%        | 89%          | 2e-149  |
|                | <i>Glycine max</i> - AAM96867           | 82%        | 89%          | 6e-139  |
|                | <i>Arabidopsis thaliana</i> - BAB78531  | 75%        | 85%          | 4e-141  |
|                | <i>Vitis vinifera</i> - XP_002281369    | 75%        | 82%          | 8e-140  |

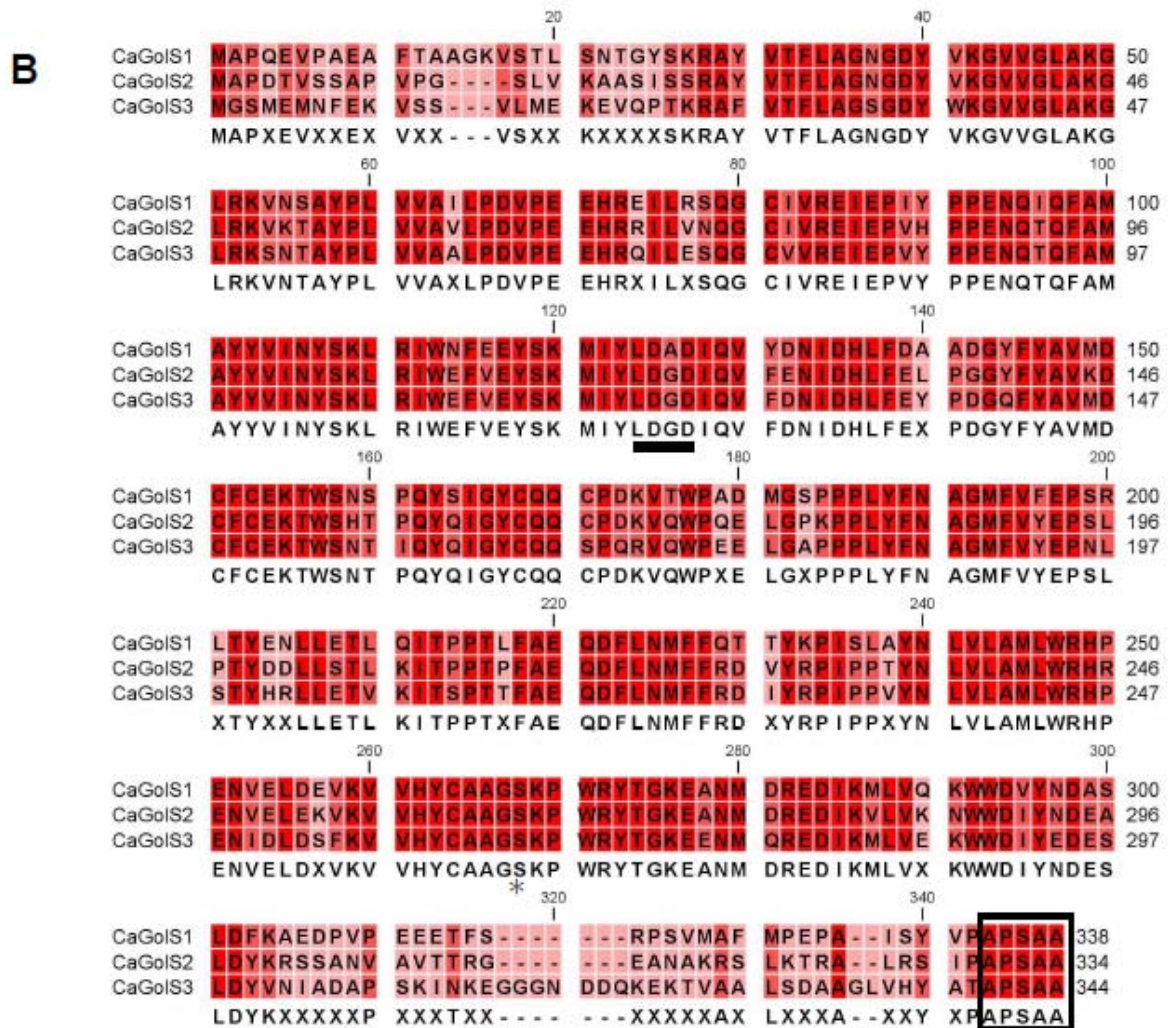
A isoforma *CaGo/S2* (1445 pb), que apresenta uma seqüência deduzida de 334 aa, demonstrou alinhamento com seqüências de outros organismos depositados no banco de dados do NCBI, com identidades variando de 74% a 79%,

sendo que os organismos que apresentaram maior similaridade foram *Capsicum annuum*, *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* e *Xerophyta viscosa* (Tabela 2).

A maior isoforma *CaGoIS3* (1702 pb) codifica uma proteína com 344 aa. Para esta isoforma foi encontrado no BlastX alinhamento com *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana* e *Vitis vinifera*, com identidades variando de 75% a 82%.

Foi realizada a construção de uma árvore filogenética pelo programa CLC (Main Workbench 4.1.1) para verificar a similaridade das três isoformas *CaGoIS1*, *CaGoIS2* e *CaGoIS3* comparando com as sequências de outros organismos e a comparação das regiões conservadas entre as três isoformas de *GoIS* (Figura 7A).





**Figura 7 – A** – Análise filogenética de três isoformas de *galactinol sintase* identificadas no Projeto Genoma Café (triângulo preto), e dos organismos que apresentaram maior similaridade: *Coffea canephora*, *Arabidopsis thaliana* (NP\_1822401.1 – *AtGoS1*; NP\_176053.1 – *AtGoS2*; NP\_172406.1 – *AtGoS3*; NP\_176250.1 – *AtGoS4*; NP\_197768.1 – *AtGoS5*; NP\_567741.2 – *AtGoS6*; NP\_176248.1 – *AtGoS7*) ; *Ajuga reptans* (CAB51533.1 – *AjGoS1*; CAB51534.1 – *AjGoS2*); *Triticum aestivum* (BAF51566.1 – *TaGoS*); *Cucumis melo* (AAL78687.1 – *CmGoS1*; AAL78686.1 – *CmGoS2*); *Oryza sativa* (ABF96069 – *OsGoS*).

**B** – Alinhamento das sequências de aminoácidos das isoformas *CaGoS1,2* e 3 (em vermelho sequências conservadas encontradas entre as isoformas), em asterisco indica região conservada de fosforilação de serina e motivo putativo para ligação manganês (barra em negrito). Análises realizadas através do programa CLC Main Workbench 4.0.

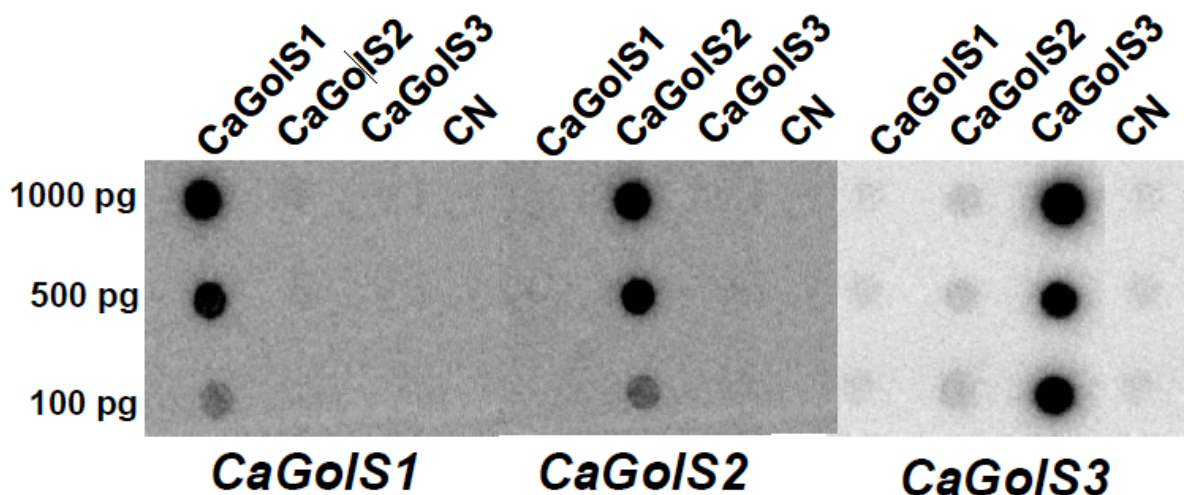
Através da análise de estatística protéica foi observado que todas as isoformas apresentam praticamente o mesmo peso molecular. A isoforma *CaGoS1* possui 38,54 kDa e pI de 4,93. *CaGoS3* apresentou uma proteína deduzida com um peso molecular de 39,59 kDa e pI 5,07. Já a isoforma *CaGoS2* apresentou um

ponto isoelétrico (pI) bastante superior em relação as outras duas isoformas (8,11) e seu peso molecular é de aproximadamente 38 kDa.

### 7.3 DOT BLOT

A técnica de Dot-Blot foi utilizada para verificar a especificidade de cada uma das sondas obtidas através do uso de enzimas de restrição para a liberação de insertos dos clones representativos de cada uma das isoformas de *CaGoIS*.

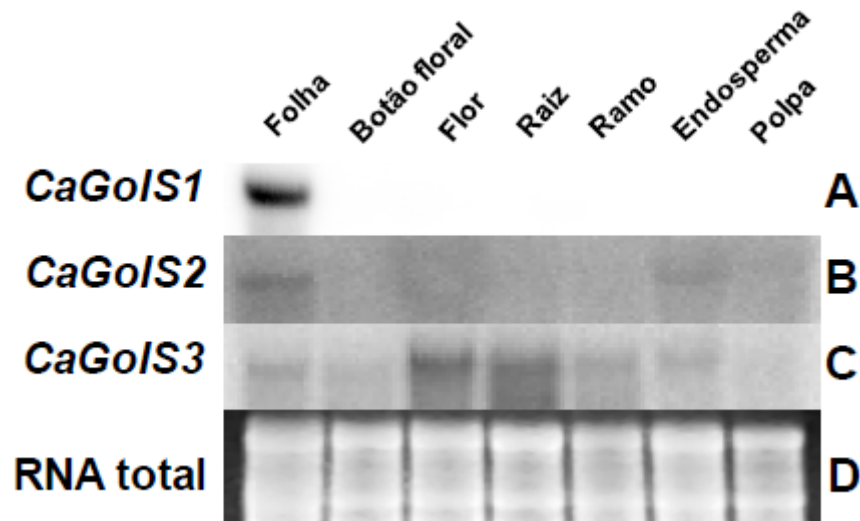
Através dessa análise foi possível verificar que não houve hibridização cruzada entre as três isoformas de *CaGoIS*, demonstrando a especificidade das sondas para cada uma das isoformas (Figura 8).



**Figura 8** – Análise de Dot-Blot para confirmação da especificidade das sondas. **A** = Hibridização específica para *CaGoIS1*. **B** = Hibridização específica para *CaGoIS2*. **C** = Hibridização específica para *CaGoIS3*. CN refere-se ao controle negativo.

### 7.4 NORTHERN BLOT DE DIFERENTES TECIDOS DE *COFFEA ARABICA* L. COM AS ISOFORMAS *CAGOLS1*, *CAGOLS2* E *CAGOLS3*

Inicialmente foi realizada análise de Northern blot em membranas contendo RNA total extraídos de diferentes tecidos de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 cultivada em condição de campo (folha, botão floral, flor, raiz, ramo, endosperma e polpa), para verificar o nível de transcrição de cada uma das três isoformas, nos diferentes tecidos (Figura 9).



**Figura 9** – Análise de expressão via Northern blot com RNA total dos diferentes tecidos do cafeeiro: folhas, botão floral, flor, raiz, ramos, endosperma e polpa. **A** = expressão da isoforma *CaGolS1*. **B** = isoforma *CaGolS2*. **C** = isoforma *CaGolS3*. **D** = RNA total para comparação de concentração das diferentes amostras.

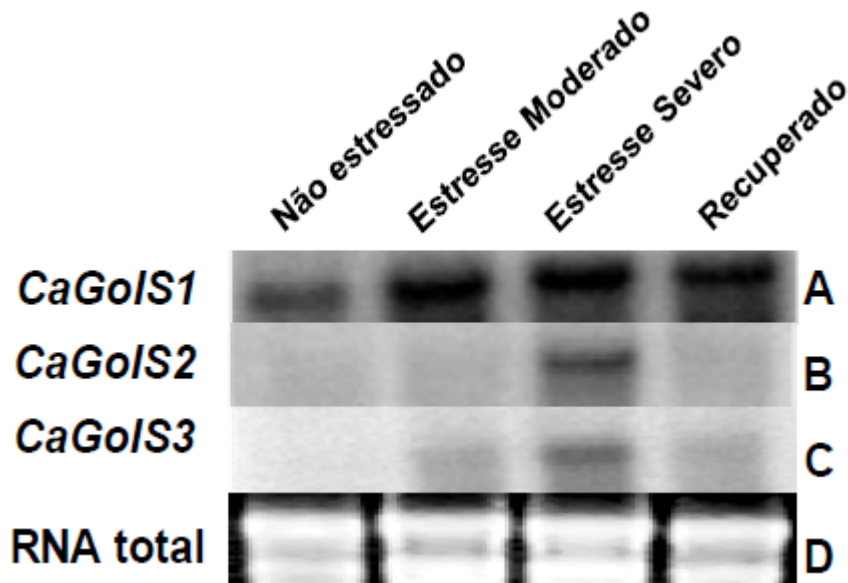
A presença de transcritos de *CaGolS1* foi observado predominantemente em folhas do cafeeiro. Não foi detectado sinais de hibridização dessa isoforma em nenhum outro de tecido do cafeeiro analisado neste trabalho (Figura 9 - A).

Na hibridização com a sonda de *CaGolS2*, foi observada a presença de transcritos em folha e em endosperma, mas com níveis mais baixos que os detectados para *CaGolS1* em ambos casos (Figura 9 - B). A análise na atividade transcricional da isoforma *CaGolS3* com a membrana contendo RNA total dos diferentes tecidos do cafeeiro, mostrou expressão principalmente em flor e raiz e em menor escala em ramo e endosperma. Assim como nas outras isoformas, a *CaGolS3* também demonstrou sinal de hibridização em folhas (Figura 9 - C).

#### 7.5 ANÁLISE DE NORTHERN BLOT DO EXPERIMENTO DE ESTRESSE HÍDRICO EM *COFFEA ARABICA* L. COM AS ISOFORMAS *CAGOLS1*, *CAGOLS2* E *CAGOLS3*

Com a finalidade de caracterizar a expressão das isoformas com maior número de reads no banco de dados do Genoma Café, foi realizado experimento com plantas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 submetidas a condições de estresse hídrico em casa de vegetação. Durante todo o período da

experimentação foram realizadas medições do potencial de água e taxa de fotossíntese, onde ficou estabelecido o seguinte critério para a análise e coleta de material vegetal (folha): planta não estressada (-1.34 MPa), estresse moderado (-2.39 MPa), estresse severo (-4.5 MPa) material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo (recuperado).



**Figura 10** – Northern blot de folhas do cultivar IAPAR-59 do experimento de estresse hídrico hibridizada com *CaGolS1*. **A** =Hibridização constitutiva para a isoforma *CaGolS1*. **B**= expressão da isoforma *CaGolS2* em condição de estresse severo. **C**= expressão de *CaGolS3*. **D**= RNA total para os diferentes níveis de estresse: não estressado, estresse moderado, estresse severo e recuperado.

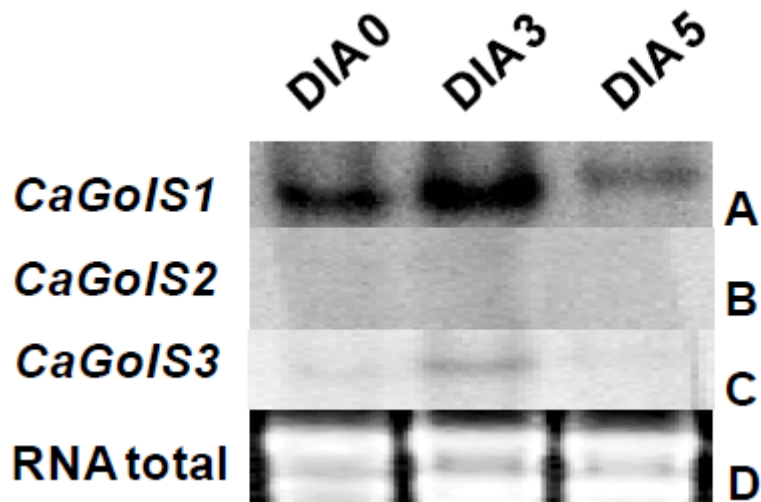
Através da análise do perfil transcricional da isoforma *CaGolS1* via Northern blot, foi observada a expressão basal desse gene em condições normais de irrigação com um aumento transcricional acentuado em plantas submetidas a déficits hídricos moderado, severo e na recuperação após o estresse (Figura 10 - A). A isoforma *CaGolS2* apresentou uma expressão claramente detectável somente em condições de estresse severo, mostrando que essa isoforma é expressa quando a planta está com baixíssimo suprimento hídrico (Figura 10 - B). Com a isoforma *CaGolS3*, assim como a *CaGolS2*, também foi observado um aumento pronunciado de transcritos nas folhas quando a planta foi submetida a um estresse hídrico severo. Nos estágios de estresse moderado e recuperado foram observados sinais de hibridização mas

em níveis mais baixos, não sendo verificada a transcrição nas plantas com condições normais de suprimento de água (Figura 10 - C).

#### 7.6 ANÁLISE DE NORTHERN BLOT DO EXPERIMENTO DE ESTRESSE TÉRMICO EM *COFFEA ARABICA* L. COM AS ISOFORMAS *CAGOLS1*, *CAGOLS2* E *CAGOLS3*

No experimento de estresse térmico, as plantas da cultivar IAPAR-59 foram mantidas em câmara de crescimento (Fitotron) durante cinco dias a 37°C após serem aclimatadas a 24°C no mesmo local por sete dias.

A isoforma *CaGoIS1* apresentou alta expressão em tecidos foliares antes de iniciar o choque de calor (dia 0) e nos dias 3 e 5 após o início do tratamento, sendo observado um grande aumento da atividade transcricional no terceiro dia de estresse, diminuindo no quinto dia de estresse térmico quando as plantas apresentavam murchamento pronunciado nas folhas (Figura 11 - A).



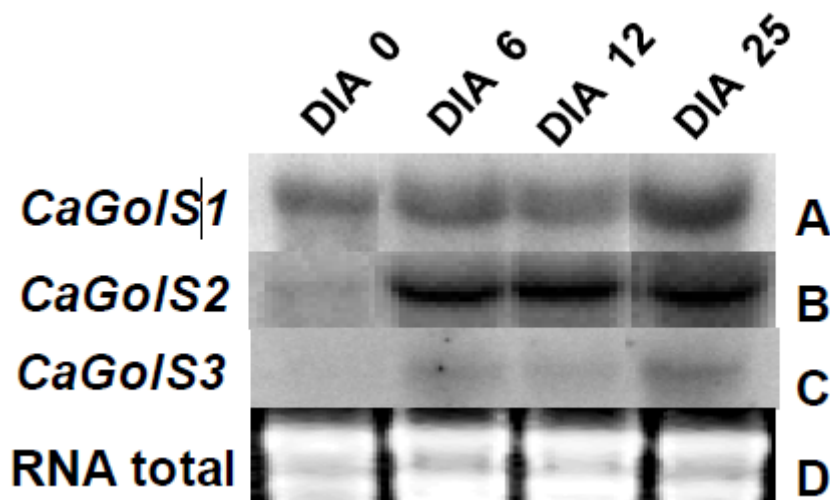
**Figura 11** – Análise de RNA total de folhas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 via Northern blot do experimento de estresse térmico hibridizado com *CaGoIS1*. Expressão apresentada pela isoforma *CaGoIS1* (A), *CaGoIS2* (B) e *CaGoIS3* (C) do estresse térmico (Dia 0), e após 3 e 5 dias de estresse a 37°C (Dia 3 e Dia 5). D= Padrão de RNA total do experimento de estresse térmico.

Neste experimento, o sinal de hibridização para isoforma *CaGoIS2* não foi detectada ou observado de modo muito tênue em folhas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 quando as plantas foram submetidas aos dois níveis de estresse térmico analisados (Figura 11 - B). Já a presença de expressão de *CaGoIS3* foi observada somente no terceiro dia de estresse térmico (Figura 11 - C).

### 7.7 ANÁLISE DE NORTHERN BLOT DO EXPERIMENTO DE ESTRESSE SALINO EM *COFFEA ARABICA* L. COM AS ISOFORMAS *CaGoIS1*, *CaGoIS2* E *CaGoIS3*

Com a finalidade de estudar o perfil transcricional das isoformas de *GoIS* em plantas de *C. arabica* submetidas a estresse salino, foi realizado um experimento em casa-de-vegetação utilizando solução de irrigação com 150mM de NaCl.

O padrão de expressão observado nesse experimento para a isoforma *CaGoIS1* mostrou-se constante durante o período inicial de estresse, (Figura 12 - A), sendo observado um aumento após 25 dias de irrigação com solução salina. Por outro lado, a isoforma *CaGoIS2* é expressa de maneira significativa já a partir do sexto dia de estresse salino, sendo transcrita de modo similar até o último dia do estresse salino. Em relação a isoforma *CaGoIS3*, sua transcrição foi detectada em níveis mais baixos que as isoformas anteriores, sendo observada a partir do sexto dia de estresse salino (Figura 12 - C).



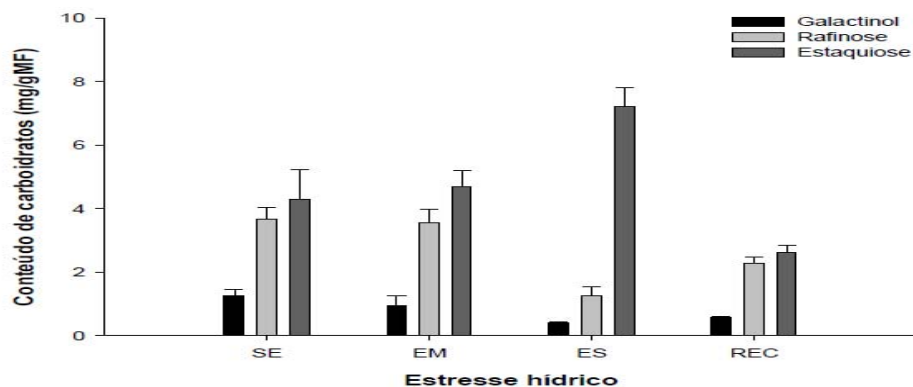
**Figura 12** – Análise de RNA total de folhas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 via Northern blot do experimento de estresse salino hibridizado com *CaGoIS1*. Expressão apresentada pela isoforma *CaGoIS1* (A), *CaGoIS2* (B) e *CaGoIS3* (C) do estresse salino (Dia 0, 6, 12 e 25). D= Padrão de RNA total do experimento de estresse salino.

## 8 QUANTIFICAÇÕES DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA DA RAFINOSE (RFOs)

### 8.1 ESTRESSE HÍDRICO

Com a finalidade de quantificar a presença dos oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs), galactinol, rafinose e estaquiose, em folhas de *C. arábica* submetidos aos diferentes tipos de estresses abióticos, diversas análises foram realizadas através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

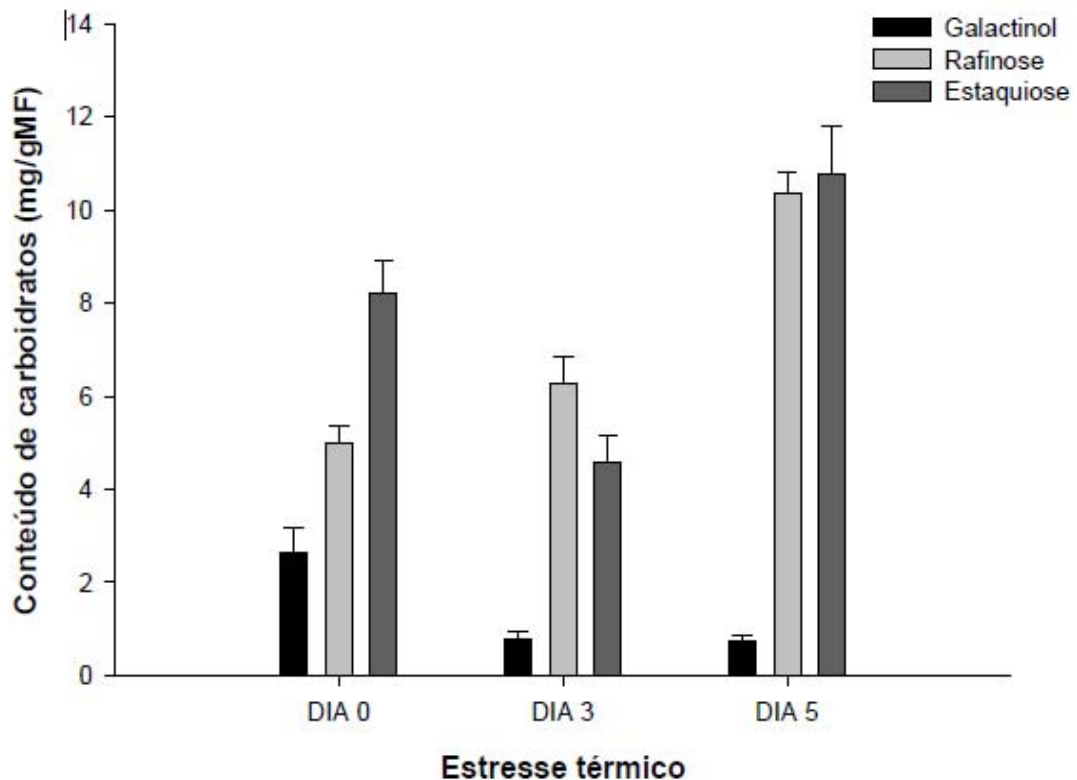
Durante o período de deficiência hídrica observou-se alteração significativa na concentração de carboidratos nas folhas da cv. IAPAR-59 (Figura 13). A quantidade de galactinol apresentada em condições normais de suprimento de água (1,7 mg/gMF) diminui com a intensidade do estresse sendo duas vezes menor no estresse severo (ES). Na recuperação das plantas houve somente um pequeno acréscimo da quantidade de galactinol em relação às plantas sob estresse severo, mas não retornou ao teor detectado em condições normais. A concentração de rafinose e estaquiose nas folhas foram bastante similares tanto em plantas irrigadas como sob deficiência hídrica moderada. Entretanto, durante o estresse severo houve uma inversão no perfil de acúmulo desses dois carboidratos, pois enquanto a rafinose mostrou uma diminuição do seu teor a estaquiose tornou-se o carboidrato predominante alcançando o seu nível máximo de acúmulo (7,5 mg/gMF). Mesmo após 72 h de recuperação (REC) os níveis desses dois carboidratos não conseguiram retornar às concentrações encontradas nas plantas no início do experimento (SE) (Figura 13).



**Figura 13** – Concentração de galactinol, rafinose e estaquiose em folhas de plantas de *C. arábica* L. sob condições de estresse hídrico. Sem estresse (SE), estresse moderado (EM), estresse severo (ES) e recuperado (REC). Valores apresentados por média  $\pm$  erro padrão (n=3).

## 8.2 ESTRESSE TÉRMICO

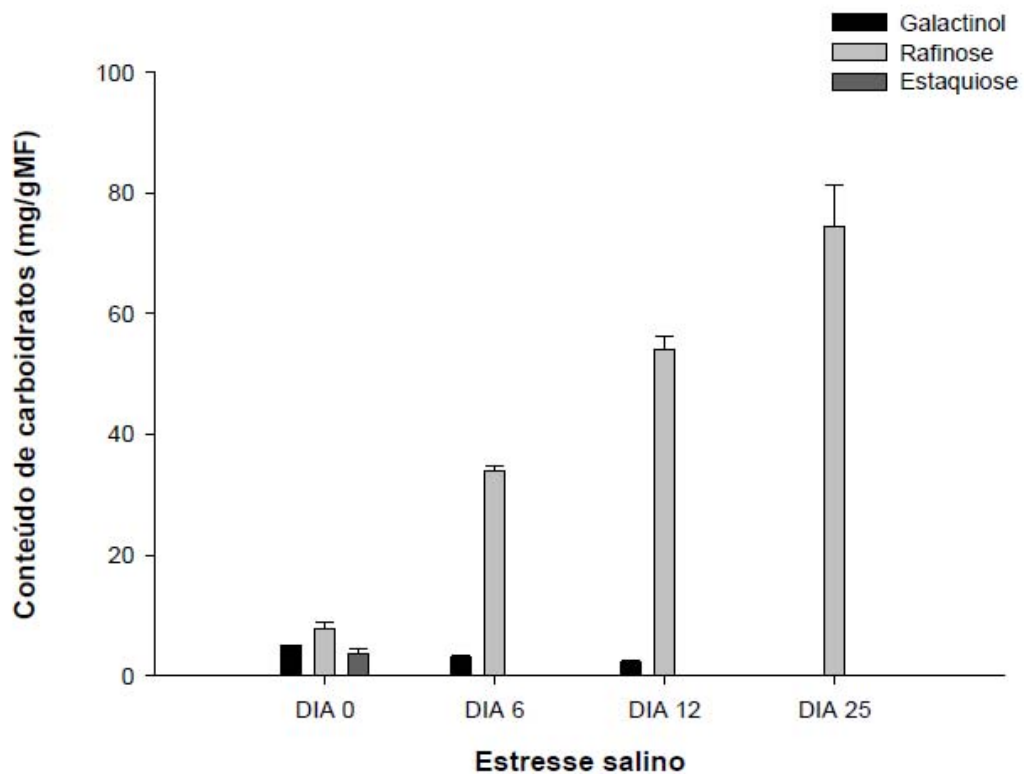
Semelhantemente ao observado durante o experimento de déficit hídrico, houve um decréscimo da quantidade de galactinol nas folhas do cafeeiro *Arabica* submetidos ao estresse. Talvez devido à severidade do estresse térmico aplicado, as concentrações de galactinol já atingiram valores similarmente pequenos aos do observados no tratamento Dia 5 logo aos 3 dias de tratamento a 37°C (1 mg/gMF). Durante o terceiro dia de estresse térmico, os níveis de rafinose elevaram-se cerca de 20% em relação ao nível basal (Dia 0) enquanto que a concentração de estaquiose diminuiu acentuadamente (4,5 mg/gMF) (Figura 16). No quinto dia de estresse térmico o acúmulo de rafinose e de estaquiose atingiu o seu máximo e com concentrações similares (cerca de 11,0 mg/gMF), cerca de nove vezes ao teor de galactinol neste mesmo tratamento.



**Figura 14** – Concentração de galactinol, rafinose e estaquiose em folhas de plantas de *C. arabica* L. sob condições de estresse térmico. Sem estresse (Dia 0), estresse moderado (Dia 3), estresse severo (Dia 5). Valores apresentados por média  $\pm$  erro padrão (n=3).

### 8.3 ESTRESSE SALINO

O perfil de acumulação de galactinol, rafinose e estaquiose sob condições de estresse salino aplicadas neste trabalho foi bastante diferente do observado nos experimentos de estresse hídrico e térmico (Figura 15). Enquanto que o teor de galactinol seguiu o mesmo padrão decrescente até não ser mais detectado após 25 dias de estresse salino, a estaquiose não foi mais detectada já no sexto dia. Por outro lado, a rafinose apresentou um aumento quase linear de acumulação até o último dia do experimento atingindo valores cerca de dez vezes acima dos observados no início do experimento (7,0 mg/gMF)



**Figura 15** – Concentração de galactinol, rafinose e estaquiose em folhas de plantas de *C. arabica* L. sob condições de estresse salino. Sem estresse (Dia 0) e 6, 12 e 25 dias após o início do estresse salino (150 mM NaCl.). Valores apresentados por média  $\pm$  erro padrão (n=3).

## 9 DISCUSSÃO

### 9.1 ANÁLISES *IN SILICO*

GoS é a primeira enzima da via biossintética dos oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs). Esta enzima funciona como galactosil transferase utilizando UDP – galactose e *mio*-inositol como substratos para a formação de galactinol e UDP. Galactinol é o doador de galactosil na síntese de rafinose e estaquiose. Genes relacionados a GoS têm sido identificados em muitas espécies de plantas, *Phaseolus vulgaris* (LIU et al., 1998), *Ajuga reptans* (SPRENGER; KELLER, 2000), *Arabidopsis thaliana* (TAJI et al., 2002), *Cucumis melo* (VOLK et al., 2003), *Solanum lycopersicum* (DOWNIE et al., 2003), *Zea mays* L. (ZHAO et al., 2004), *Glycine Max* (STOLF, 2005), *Xerophyta viscosa* (Baker) (PETERS et al., 2007) e *Coptis japonica* (TAKANASHI et al., 2008), sendo incluídos entre os que apresentam resposta aos estresses abióticos.

As buscas para o gene *GoS* no banco do Projeto Genoma Café foi realizado através de palavra-chave pela ferramenta “keyword search”, sendo possível identificar 91 sequências que foram agrupadas em 11 contigs. Para esse estudo apenas 3 contigs foram selecionados em função do número de ESTs, na qualidade das sequências, por apresentarem alta similaridade com as sequências de *galactinol sintases* de outros organismos e por apresentarem a ORF completa.

As isoformas receberam a denominação de *CaGoS1*, *CaGoS2* e *CaGoS3*, e quando comparadas com outros organismos apresentam identidade variando de 75 a 83%. As três isoformas de *CaGoS* apresentam o pentapeptídeo APSAA na região carboxi terminal (SPRENGER; KELLER, 2000; TAJI et al., 2002; TAKANASHI et al., 2008) e um motivo putativo ligação-manganês, que é uma sequência muito conservada na maioria das galactosil transferases (BRETON et al., 1998; WIGGS; MUNRO, 1998; TAKANASHI et al., 2008) (Figura 7).

Como esperado, as três isoformas de *CaGoS* apresentaram domínio para glicosiltransferase, que catalisa a transferência de moléculas de açúcar a partir de moléculas doadoras, ativando moléculas específicas que fazem ligações glicosídicas (CAMPBELL et al., 1998). A *CaGoS1* apresentou uma proteína deduzida de 338aa com um peso molecular de 38,54 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 4,93. *CaGoS2* possui uma proteína de 334aa, com peso molecular de 38,00 kDa e pI 8,11, enquanto que a isoforma *CaGoS3* apresenta uma proteína de 344aa com

peso molecular de 39,59 kDa e pI 5,07. Comparativamente às isoformas de *Go/S* em *A. thaliana*, relacionadas à resposta desta planta a estresses abióticos, a *CaGo/S1* e 2 não apresentaram diferenças significativas em relação ao pI e massa molecular. Quando realizado a predição de peptídeos nos programas TargetP 1.1 Server e PSORT - Prediction of Protein Localization Sites version 6.4, não foi detectado peptídeo de direcionamento para nenhuma organela confirmando que essa proteína atua no citoplasma. As diferenças de pI observadas entre as isoformas demonstram que possivelmente a proteína expressada pela isoforma *CaGo/S2* tem uma melhor atividade que a *CaGo/S1* e a *CaGo/S3*. A variação do pI pode estar associada a muitas propriedades da proteína, tais como mudança na localização subcelular, polimerização e conformação.

Embora tenha sido identificado e caracterizado somente três isoformas no banco de ESTs do Projeto Genoma Café, não há relatos na literatura de organismos contendo muitas isoformas. Em *A. thaliana* foram identificadas sete isoformas, sendo que *AtGo/S1*, 2 e 3 estão envolvidas na resposta a estresse abióticos (TAJI et al., 2002), semelhantemente ao encontrado neste trabalho com a *CaGo/S1*, 2 e 3.

## 9.2 ANÁLISES MOLECULARES

Quando um estudo é proposto para identificar e estudar a expressão de transcritos de várias isoformas de um mesmo gene, o trabalho inicial de caracterização é fundamental para a obtenção de sondas específicas. Neste estudo a verificação se as sondas eram específicas para *CaGo/S1*, 2 e 3 foi realizada através da técnica de Dot blot, que demonstraram a não ocorrência de hibridização cruzada entre as sondas (Figura 8).

### 9.2.1 Northern Blot dos Diferentes Tecidos de *Coffea Arabica* cv. IAPAR-59 com as Isoformas *CaGo/S1*, 2 e 3

A partir da obtenção das sondas foi realizado análise de Northern Blot utilizando membranas contendo RNA total dos diferentes tecidos do cafeeiro. A presença de transcritos das três isoformas de *CaGo/S* foi detectada predominantemente em folhas, destacando-se a *CaGo/S1*, o que confirma a maior presença de transcritos desse gene em tecido foliar (VOLK et al., 2003). Enquanto

que a *CaGo/S2* apresentou baixos níveis de expressão em folhas e endosperma, isoforma *CaGo/S3* foi detectada em folhas, flores, raízes, ramos e endosperma (Figura 9). Joet et al. (2009), reportam a existência de quantidades substanciais de galactinol no perisperma do fruto de café e o acúmulo de RFO durante o desenvolvimento do endosperma (tecido de reserva) de café. A presença desses carboidratos no perisperma e endosperma no café está associada na regulação de fonte-dreno, pois esta é uma característica apresentada pelas plantas superiores, onde o metabolismo de açúcares tem demonstrado ser essencial durante o controle e desenvolvimento de sementes (HERBERS; SONNEWALD, 1998). No milho (*Zea mays*) três genes de *Go/S* predominam em sementes, sendo que *ZmGo/S3* está presente na maturação e dessecação, enquanto que *ZmGo/S2* é expresso após a maturação e germinação sob condições de dessecação (ZHAO et al., 2004). Em nosso caso, as isoformas *CaGo/S2* e *CaGo/S3* foram detectadas no endosperma, mas em níveis baixos. Como a quantidade de rafinose e estaquiose em endosperma de café no final da maturação é muito baixo, a expressão de genes das enzimas que controlam a via da biossíntese de RFOs deve ser maior nos estádios de desenvolvimento iniciais ou em tecidos específicos do fruto do cafeeiro (ex., perisperma).

#### 9.2.2 Northern Blot do Experimento de Estresse Hídrico com as Isoformas *CaGo/S1*, 2 e 3

Grande parte da regulação biológica responsável pelas alterações metabólicas e fisiológicas em resposta às mudanças ambientais ocorre na regulação da expressão dos genes envolvidos nestes processos (SHINOZAKI; DENNIS, 2003). Genes de *Go/S* têm sido identificados em muitas espécies de plantas e sua expressão está relacionada com a resposta ao estresse. Através do experimento de estresse hídrico com *Coffea arabica* cv IAPAR-59 foi possível verificar que a transcrição da isoforma *CaGo/S1* foi detectada durante todo o período de deficiência hídrica, ocorrendo um aumento significativo do sinal de hibridização no estresse moderado, severo e na recuperação das plantas após a reidratação (Figura 10). A isoforma *CaGo/S2* apresentou expressão significativa somente em condições severas de deficiência hídrica.

As análises de hibridização com a sonda de *CaGo/S3* mostraram aumento da quantidade de transcritos desta isoforma nos três tratamentos após o início da aplicação do estresse, principalmente em condições de estresse severo. Assim como em *A. thaliana*, nossos dados demonstram que há pelo menos três isoformas que estão relacionados a estresses abióticos em cafeeiro (TAJI et al., 2002). Estes autores relataram que a superexpressão de *AtGo/S2* aumentou os níveis de galactinol e rafinose nas folhas, e que esses carboidratos estariam promovendo a tolerância da planta em condições de seca. Uma das consequências atribuída à falta da disponibilidade hídrica no solo é a redução substancial da expansão dos órgãos (LAWLOR; CORNIC, 2002), levando a limitação do consumo de carboidratos pelos drenos (QUICK et al., 1989), sendo que tal acúmulo de carboidratos pode ser uma forma da planta se adaptar a condição hídrica desfavorável. Altos níveis de expressão de *Go/S* em condições de estresse hídrico (19% de RWC) também foram observados em *Xerophyta viscosa* (resurrection plant) por PETERS et al. (2007). Em conjunto, esses resultados indicam a importância do aumento da atividade transcricional da *Go/S* para o acúmulo de RFOs, que por sua vez desempenham um papel de proteção contra os efeitos da seca pela proteção de membranas das mudanças de fase lipídica induzida por dessecação, pela vitrificação de proteínas a temperaturas fisiológicas de ainda pelo armazenamento de carbono (LEPRINCE et al., 1993).

Quando ocorre uma desidratação mais acentuada pode ocorrer o estresse oxidativo, desencadeando efeitos secundários prejudicando toda a maquinaria fotossintética (ORT, 2001). A capacidade de dissipação de energia (FLEXAS et al., 2002) e proteção metabólica (induzida ou constitutiva) contra os efeitos das espécies reativas de oxigênio (FOYER et al., 1994), pode ser elementos chave para o sucesso das plantas sob condições de seca. O papel da galactinol e das RFOs não está ligado somente a osmoproteção, mas também pode agir na remoção de ROS, proporcionando assim uma maior proteção no metabolismo celular e em particular protegendo a maquinaria fotossintética contra os danos oxidativos causados pela salinidade, baixas temperaturas e seca (NISHIZAWA et al., 2008).

Durante o período de estresse hídrico severo a alta expressão de todas as isoformas de *CaGo/S*, pode ser um indício da necessidade de alta produção de RFOs para atuar como osmoprotetores contra possíveis danos

celulares. Ao nível bioquímico, pouco se sabe ainda sobre o mecanismo de tolerância à seca em cafeeiro (LIMA et al., 2002; DaMATTA et al., 2002, 2003). Entretanto, foi relatado que alguns cultivares de café realizam ajuste osmótico sob déficit hídrico (DaMATTA et al., 1993), processo este que deve contar com o auxílio do acúmulo de carboidratos conforme observado por DaMATTA et al. (1997).

### 9.2.3 Northern blot do experimento de estresse térmico com as isoformas

#### *CaGolS1*, 2 e 3

Da mesma maneira que o observado em condições de seca, a hibridização da membrana contendo RNA total de plantas submetidas ao estresse térmico evidenciou um forte aumento da expressão transcricional da isoforma *CaGolS1* em folhas de *C. arabica*, havendo um declínio da expressão no quinto dia quando as folhas já apresentavam sinais de danos severos. Inúmeros genes podem desencadear esse tipo de comunicação cruzada (cross-talk), onde várias vias de sinalização são ativadas (RIZHSKY et al, 2004). Embora o estresse hídrico e o estresse térmico têm sido amplamente estudados (INGRAM; BARTELS, 1996; SHINOZAKI; YAMAGUCHI- SHINOZAKI, 1996; MIERNYK, 1999; QUEITSCH et al., 2000), sabe-se ainda pouco sobre a combinação e os efeitos desses estresses sobre as plantas. Diferentemente, não foi observado sinais visíveis de hibridização da isoforma *CaGolS2* sob as condições de estresse térmico aplicadas neste trabalho, mostrando a expressão diferencial desta isoforma conforme o tipo de estresse abiótico. Em relação à isoforma *CaGolS3* observou-se a presença de transcritos somente no terceiro dia de estresse térmico.

Ao contrário do estresse hídrico e baixas temperaturas, a aquisição da tolerância ao estresse térmico está relacionado com a regulação bem caracterizada de transcritos de genes codificando proteínas de choque térmico, incluindo fatores de transcrição. Em *A. thaliana*, a expressão de *GoS1* e *GoS2* é regulada por fatores de transcrição HsfA1a, HsfA1b e HsfA2 (PARNIKULANGARA et al., 2004; BUSCH et al., 2005; SCHRAMN et al., 2006). Outros estudos também identificaram transcritos adicionais que aumentaram substancialmente após o tratamento de estresse térmico, como os membros da família DREB2, galactinol sintase e outras enzimas pertencentes à família dos oligossacarídeos da rafinose (RIZHSKY et al., 2004; BUSCH et al., 2005; LIM et al., 2006; SCHRAMM et al.,

2006; KILIAN et al., 2007), Parnikulangara et al. (2004) mostraram que em *A. thaliana* superexpressando o fator de transcrição HSF3 foi observado um aumento significativo nos níveis de galactinol e rafinose após duas horas sob condição de estresse térmico. O gene *AtGo/S1* é um dos genes que são induzidos pelo calor em *A. thaliana*, porém apresentou níveis de RNAm constitutivos em plantas transgênicas expressando o gene do fator de transcrição relacionada à resposta a altas temperaturas. A conclusão de que *AtGo/S1* é um alvo verdadeiro na regulação de HSF foi confirmada através de investigações em plantas transgênicas carregando a construção com o promotor *Go/S* e gene repórter *GUS* (PARNIKULANGARA et al., 2004).

#### 9.2.4 Northern blot do Experimento de Estresse Salino com as Isoformas *CaGo/S1*, 2 e 3

O padrão de expressão observado para a isoforma *CaGo/S1* se manteve similar ao nível de transcrição constitutiva (planta controle não estressada) durante o período inicial de estresse salino, sendo observado um aumento transcricional no vigéssimo quinto dia. Ao observar o padrão de expressão da isoforma *CaGo/S2* e *CaGo/S3* no experimento de estresse salino (Figura12), fica evidenciada a indução diferencial dessas isoformas perante diferentes situações de estresses abióticos. Taji et al. (2002), reportam para *AtGo/S1* e *AtGo/S2* a indução desses genes sob condições de estresse hídrico e salino. O estresse causado pelo aumento de cloreto de sódio em determinadas plantas, faz com que esses elementos sejam acumulados em maior quantidade nas folhas (PARIDA et al., 2004), local este onde foi observada a presença de transcritos para as isoformas de *galactinol sintase* do cafeeiro.

Compostos nitrogenados e açúcares (como a rafinose e a estaquiose) são alguns exemplos de osmólitos que resguardam estruturas e sustentam o balanço osmótico na planta (SINGH et al., 2000; KEREPESEI; GALIBA, 2000; TAJI et al., 2002). Durante o estresse salino os osmólitos facilitam a retenção de água no citoplasma e permitem o seqüestro de Na<sup>+</sup> para o vacúolo ou apoplasto (ASHRAF; HARRIS, 2004). A alta expressão dos genes *Go/S* detectada em cafeeiros submetidos à salinidade sugerem que as RFOs podem atuar na proteção

das estruturas celulares através da sua interação com membranas, complexos protéicos ou enzimas e facilitar o processo de compartimentalização de sais.

#### 9.2.5 Acúmulo de galactinol, rafinose e estaquiose durante os estresses abióticos

Os carboidratos apresentam inúmeras funções nas plantas, e estão envolvidos em diversas vias metabólicas e participam da regulação de vários genes especialmente aqueles envolvidos no metabolismo dos oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs). Os RFOs são uma importante fonte de reserva de carbono disponível durante a germinação das sementes, e são também considerados metabólitos tolerantes durante o estresse hídrico e baixas temperaturas (KELLER; PHARR, 1996; PETERBAUER e RICHTER, 2001). A tolerância a dessecação esta associada com o aumento nos níveis de RFOs descrita por vários autores em diferentes organismos *Brassica campestris* (SINNIAH et al., 1998), *Vicia faba* (LAHUTA et al., 2000), e sementes de *Acer spp* (PUKACKA; WÓJKIEWICZ, 2002).

Plantas em condições normais de suprimento de água, com idade superior a 1,6 anos utilizadas nos experimentos de déficit hídrico e térmico, apresentaram maior quantidade de estaquiose nas folhas. Por outro lado, nesta mesma condição no início do experimento de estresse salino, a rafinose apresentou-se como o oligossacarídeo com a concentração mais elevada, o que pode ser devido à idade das plantas utilizadas neste caso. Ao contrário do encontrado neste trabalho com café Arábica, não foi observado a ocorrência do acúmulo de galactinol e rafinose em plantas não estressadas de *A. thaliana* (TAJI et al., 2002).

Já a partir do estresse hídrico moderado notou-se que os níveis de estaquiose em folhas de *C. arabica* foram maiores do que os de rafinose, acentuando esta diferença no estresse severo (seis vezes mais). O aumento ou a manutenção da concentração de carboidratos, mesmo sob déficit hídrico, também tem importância no ajustamento osmótico. A presença dos altos níveis de rafinose durante o estresse abiótico está bem estabelecida, mas recentemente foi demonstrado que nem sempre o acúmulo de rafinose está relacionado na melhora da tolerância a baixas temperaturas em *A. thaliana* (ZUTHER et al., 2004).

As quantificações de RFOs para o experimento de estresse térmico demonstrou que enquanto a quantidade de rafinose nas folhas do cafeeiro aumentou mais gradualmente entre os dois níveis de estresse a de estaquiose elevou-se do

modo mais abrupto, alcançando valores similares a rafinose no final do período de estresse térmico aplicado, mostrando a importância desses RFOs na resposta do *C. arabica* a choques térmicos.

Quanto à resposta das plantas de café Arábica ao estresse salino, é interessante notar que além da quantidade de rafinose apresentou um acúmulo extremamente elevado em todos os dias analisado. Taji et al. (2002) relatam que plantas induzidas ao estresse hídrico e salino desencadearam a expressão do gene *galactinol sintase*, e acumularam altos níveis de rafinose e galactinol. Diferentemente do observado neste estudo com *C. arabica*, aqueles autores informam que não ocorreu acúmulo de estaquiase nas folhas, flores em plantas de *A. thaliana*.

Em nosso trabalho, embora tenha sido detectado uma alta expressão das isoformas de *CaGo/S*, principalmente a isoforma *CaGo/S1*, durante todos os experimentos de estresses abióticos, os resultados de quantificação de galactinol nas folhas de *C. arabica* não correspondem à atividade transcricional dessas isoformas. Uma dessas razões pode ser resultado da atividade de outras enzimas *downtream* da via metabólicas das RFOs, como a rafinose e a estaquiase sintases. Em folhas de cafeeiro possivelmente o galactinol foi utilizado como substrato para a biossíntese dos oligossacarídeos de mais alta massa molecular pelas diferentes glicosiltransferases, conforme pode ser deduzido pelo acúmulo de rafinose e estaquiase nas folhas de *C. arabica* ao longo do período de estresse e a consequente redução dos níveis de galactinol neste mesmo período.

Também a degradação diferencial dos oligossacarídeos poderia explicar essa dessemelhança entre transcrição e acúmulo de metabólitos. Joet et al. (2009), em um estudo do metabolismo das principais vias relacionadas no armazenamento de compostos em café, mostrou que o galactinol na fase de perisperma e rafinose e estaquiase acumulam por pouco tempo no endosperma.

## CONCLUSÃO

Através desse trabalho foi possível mostrar que as três isoformas de *CaGoIS* (*CaGoIS1*, 2 e 3) apresentaram diferenças temporais no padrão transcricional folhas de *C. arabica* durante a submissão a vários tipos de estresses abióticos, resultando em diferentes modos de regulação gênica. Como esperado, os resultados já descritos em diversas espécies, a expressão transcricional das três isoformas deuse predominantemente em tecido foliar, mas também em menor quantidade em outros tecidos, como raízes e endosperma, como é o caso da *CaGoIS3*.

Foi possível verificar que a isoforma *CaGoIS1* é a que apresenta a maior atividade transcricional em folhas de *C. arabica* tanto constitutivamente como sob condições de deficiência hídrica, térmica e estresse salino. A *CaGoIS2* somente mostrou ter um papel mais específico, pois o aumento transcricional desta isoforma deu-se em condições severas de disponibilidade hídrica e em resposta ao estresse salino. O padrão transcricional apresentado pela *CaGoIS3* indica expressão em todos os estresses aplicados, mas em níveis mais baixos que a isoforma *CaGoIS1*. Através das quantificações de rafinose e estaquiose é possível confirmar que estes dois oligossacarídeos devem atuar na osmoproteção de *C. arabica* contra agentes estressantes da mesma forma já relatada em outras plantas. Nossos dados também mostram que em café Arábica, o tipo e o nível de estresse tem uma influência direta sobre qual carboidrato é acumulado e a sua quantidade na folhas.

O entendimento de como as plantas de cafeeiro responde aos estresses ambientais é fundamental para a sustentabilidade deste sistema agrícola. Este trabalho tentou buscar novos conhecimentos sobre a contribuição de isoformas da *galactinol sintase* (*CaGoIS*) na resposta a estresses abióticos em *C. arabica*. Como a galactinol sintase é a enzima chave na síntese de oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) e estes estão envolvidos diretamente na resposta das plantas a diferentes tipos de estresse, os dados obtidos neste trabalho podem servir de base para estudos futuros visando à obtenção de promotores estresse-induzidos e a seleção de germoplasma com variabilidade na produção de RFOs para possível uso em análises da associação dessa característica com tolerância a estresses abióticos.

## REFERÊNCIAS

- ABE, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T. et al. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **The Plant Cell** 9, 1859–1868, 1997.
- ALBINI, F. M.; MURELLI, C.; PATRITTI, G. et al. Low-molecular weight substances from the resurrection plant *Sporobolus stapfianus*. **Phytochemistry**, 37, 137-142, 1994.
- ALBRECHT, V.; WEINL, S.; BLAZEVIC, D. et al. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. **The Plant Journal** 36, 457–470, 2003.
- ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. **Plant Physiology**. 100:224-233, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** 25, 3389–3402, 1997.
- ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5350–5354, 1977.
- ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; ASTORGA, C. et al. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 894–900, 2002.
- AOKI, N.; ONO, K.; SASAKI, H. et al. Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration on photosynthetic carbon metabolism in flag-leaf blades of rice before and after heading. **Plant Production Science** 6: 52- 58. 2003.
- APSE, M. P.; AHARON, G. S.; SNEDDENW, A. et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. **Science** 285, 1256–1258, 1999.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, 166: 3–16, 2004.
- AVONCE, N.; LEYMAN, B.; MASCORRO-GALLARDO, J. O. et al. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. **Plant Physiology**, 136:3649-3659, 2004. AYRE, B. G., KELLER, F., TURGEON, R. Symplastic continuity between companion cells and the translocation stream: longdistance transport is controlled by retention and retrieval mechanisms in the phloem. **Plant Physiology**, 131, 1518–1528, 2003.

- BACHMANN, M.; MATILE, P.; KELLER, F. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. (cold acclimation, translocation, and sink to source transition: discovery of chain elongation enzyme). **Plant Physiology**, 105, 1335–1345, 1994.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **CRC Critical Review Plant Science**, 24: 23–58, 2005.
- BERRY, J.; BJORKMAM, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, 31:491-543, 1980.
- BOHNERT, H.J.; GONG, Q.; LI, P. et al. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. **Current Opinion Plant Biology**, 9, 180-188, 2006.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plants Physiologists**, 1366p. 2000.
- BUSCH, W.; WUNDERLICH, M.; SCHOFFL, F. Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** 41: 1–14, 2005.
- BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** 20, 261–275, 2003.
- CAMARGO, A.P.; CAMARGO, M.B.P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, 60: 65-68, 2001.
- CAMPBELL, J. A.; DAVIES, G. J.; BULONE, V. et al. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, Page info: 929-39, 1998.
- CARVALHO, L. M.; SILVA, E.M.; AZEVEDO, A. A. et al. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conillon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p.411-416, 2001.
- CASAGRANDE, E. C. et al. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas – SP, v.13, n.2, 2001.
- CASTILLO, E. M.; DE LUMEN, B. O.; REYES, P. S. et al. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemical**, 38: 351-335, 1990.

CHAITANYA, K. V.; JUTUR, P. P.; SUNDAR, D. et al. Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. **Plant Growth Regulation**, 40: 75- 80, 2003.

CHANG, S.; PURYEAR J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.113-116, 1993.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant, **Funct. Plant Biol.**, 30 239–264, 2003.

CHEONG, Y.H.; KIM, K.N.; PANDEY, G.K. et al. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 15, 1833–1845, 2003.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.Br>>. Acesso em: 11 de março de 2008.

CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; NGUYEN, K.H. et al. Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? **Biochimica et Biophysica Acta**, 1280: 187-196, 1996.

DaMATTA, F. M.; RENA, A. B. Relações hídricas no cafeeiro. In: DAMATA, F. M.; RENA, A. B. Palestras do **I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Brasília: Embrapa Café, p 09, 2002.

DaMATTA, F. A. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review, **Field Crops Research**, 86:99 – 114, 2004.

DaMATTA, F. A.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18 (1): 55 – 81, 2006.

DaMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, 164: 111-117. 2003.

DaMATTA, F. M.; LOOS, R. A.; SILVA, E. A. et al. Effects of soil water déficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of potgrown *Coffea canephora* Pierre. **Trees**, 16: 555-558. 2002.

DaMATTA, F. M.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. **Photosynthetica**, 34: 257-264. 1997.

DaMATTA, F. M.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. et al. Water relations of coffee leaves (*Coffea arabica* and *C. canephora*) in response to drought. **Journal of Horticultural Science**, 68: 741-746. 1993.

DE CASTRO, R.D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p.175-199, 2006. DE LUMEN, B. O. Molecular strategies to improve protein quality and reduce flatulence in Legumes: A review. **Food Structure**, 11: 33-46, 1992.

DEY, P.M. D-Galactoside containing oligosaccharides. In: Dey, P.M. AND Dixon, R.A. (Eds.) Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants. **Academic Press**, New York, p.53-129, 1985.

DOWNIE, B.; GURUSINGHE, S.; DAHAL, P. et al. Expression of a *GALACTINOL SYNTHASE* gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. **Plant Physiology**, 131: 1347–1359, 2003.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 106, 119-133, 2005.

EIRA, M.T.S.; DA SILVA, E.A.A.; DE CASTRO, R.D. et al. Coffee seed physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.149-163, 2006.

FALCONE, D, L.; OGAS, J, P.; SOMERVILLE, C. R. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. **BMC Plant Biology**, 4: 17, 2004.

FARRANT, J. M. Mechanisms of desiccation tolerance in angiosperm resurrection plants. In: Jenks MA, Wood AJ, eds. Plant desiccation tolerance. Wallingford, UK: CAB International (in press), 2007.

FOYER, C. H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K. J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia plantarum**, v. 92, p. 696-717, 1994.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATO, R. et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 17:3470-3488, 2005.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plant: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annals Botany**, v. 89, p. 183-189, 2002.

GEIGER, D. R. Understanding interactions of source and sink regions in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 25: 659-666, 1987.

GILMOUR, S. J.; THOMASHOW, M. F. Cold acclimatization and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, 17: 1233–1240, 1991.

GILMOUR, S. J.; SEBOLT, A. M.; SALAZAR, M. P. et al. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. **Plant Physiology**, 124, 1854–1865, 2000.

GIROTTI, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects and cytoprotective mechanisms. **Journal Photochemistry Photobiology**, v. 63, p. 103-113, 2001.

GOUVEIA, N. M. **Estudo da diferenciação e crescimento das gemas florais de *Coffea arabica* L.: observações sobre antese e maturação dos frutos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 237 p. 1984.

GUERREIRO FILHO, O. *Coffea racemosa* Lour. une revue. **Café Cacao Thé** (Paris), vol. XXXVI, no 3, p. 171-186, 1992.

HALL, A. E. Crop Responses to the Environment. CRC Press, Boca Raton, FL. 2001.

HARITATOS, E.; KELLER, F.; TURGEON, R. Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: implications for phloem loading. **Planta**, 198, 614–622, 1996.

HERBERS, K.; SONNEWALD, U. Molecular determinants of sink strength. **Current Opinion in Plant Biology**, 1, 207–216, 1998.

HOUDE, M.; BELCAID, M.; OUELLET, F. et al. Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress. **BMC Genomics**, 7:149, 2006.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, 47: 377–403, 1996.

JANG, J.C., SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants, **Trends Plant Science**, 2 208–214, 1997.

JIANG, Y.; YANG, B.; HARRIS, N. S. et al. Dehydro. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 13, pp. 3591–3607, 2007.

JOET, T. et al. Metabolic pathways in tropical dicot albuminous seeds: *Coffea arabica* as a case study. **New Phytologist**, 2009.

KANDLER, O.; HOPF, H. Occurrence, metabolism, and function of oligosaccharides. In: Preiss, J. (Ed.) *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol. 3. Carbohydrates: structure and function.* New York, **Academic Press**, p.221- 270, 1980.

KANG, J. Y.; CHOI, H. I.; IM, M. Y. et al. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. **The Plant Cell**, 14, 343–357, 2002.

KAPLAN, F.; KOPKA, J.; HASKELL, D. et al. Exploring the temperature stress metabolome of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 136: 4159–4168, 2004.

KARNER, U.; PETERBAUER, T.; RABOY, V. et al. Myo-inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. **Journal of Experimental Botany**, 55, 1981–1987, 2004.

KASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, 51, 463-499, 2000.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S. et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress- inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, 17, 287–291, 1999.

KAV, N. N. V.; SRIVASTAVA, S.; GOONEWARDENE, L. et al. Proteome level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. **Annals of Applied Biology**, 145, 217–230, 2004.

KELLER, F.; PHARR, D. M. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides. In E Zamski, AA Schaffer, eds, *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships.* Marcel Dekker, New York. p.157-183, 1996.

KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and salt stress induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, 40: 482–487, 2000.

KILIAN, J.; WHITEHEAD, D.; HORAK, J. et al. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. **Plant Journal**, 50: 347–363, 2007.

KIM, S. J.; KIM, M. R.; BEDGAR, D. L. et al. Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences - U S A** 10(6): 1455-1460, 2004.

KIM, M. S.; CHO, S. M.; KANG, E. Y. et al. Galactinol Is a Signaling Component of the Induced Systemic Resistance Caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 Root Colonization. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Dec;21(12):1643-53, 2008.

KINRAIDE, D. Interactions among Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects. **Journal of Experimental Botany**, 50: 1495-1505, 1999.

KREPS, J. A.; WU, Y.; CHANG, H. S. et al. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiology**, 130, 2129–2141, 2002.

KUO, T. M.; LOWELL, A. C.; SMITH, P. T. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. **Plant Science**, 125: 1-11, 1997.

KUO, T. M.; VANMIDDLESWORTH, J. F.; WOLF, W. J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 36, 32-36, 1988.

LAHUTA, L. B.; LOGIN, A.; REJOWSKI, A. et al. Influence of water deficit on the accumulation of sugars in developing field bean (*Vicia faba* var. minor) seeds. *Seed Science and Technology* 28, 93–100, 2000.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, RiMa Artes e Textos, 2000.

LARKINDALE, J.; KNIGHT, M, R. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. **Plant Physiology**, 128: 682–695, 2002.

LARKINDALE, J.; HALL, J. D.; KNIGHT, M, R. et al. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. **Plant Physiology**, 138: 882–897, 2005.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular General Genetics**, 261 :259-266. 1999.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; TROUSLOT, P. et al. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences nuclear ribosomal DNA. *Treor. Appl. Genetic*, 94: 947-955, 1997.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water déficits in higher plants. **Plant Cell and Environment**, 25: 275-294. 2002.

LEE, C. Y.; SHALLENBERGER, R. S.; VITTUM, M. T. Free sugars in fruits and Vegetables. *New York Food Life Science Bulletin*, 1, 1-12, 1970.

LEOPOLD, A. C.; SUN, W. Q.; BERNAL-LUGO, I. The glassy state in seeds: analysis and function. ***Seed Science Research***, 4: 267-274, 1994.

LEPRINCE, O.; VAN DER WERF, A.; DELTOUR, R. et al. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. ***Physiologia Plantarum***, 84: 581-588, 1992.

LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B. et al. Genetics of coffee quality. ***Brazilian Journal of Plant Physiology***, v. 18, n.1, p. 229-242, 2006.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. ***Seed Science Research***, Wallingford, v.3, n.3, p.231-246, Sept. 1993.

LI, C. R.; LIANG, Y. H.; HEW, C. S. Responses of Rubisco and sucrose-metabolizing enzymes to different CO<sub>2</sub> in a C<sub>3</sub> tropical epiphytic orchid *Oncidium goldiana*. ***Plant Science***, 163: 313-320. 2001.

LIMA, A. L. S.; DaMATTIA, F. M.; PINHEIRO, H. A. et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. ***Environmental and Experimental Botany***, 47: 239- 247, 2002.

LIM, C. J.; YANG, K. A.; HONG, J. K. et al. Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells. ***Journal Plant Research***, 119: 373–383, 2006.

LIU, J. J. J.; KRENZ, D. C.; GALVEZ, A. F. et al. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. ***Plant Science***, 134, 11–20, 1998.

LOWELL, C. A., KUO, T. M. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. ***Crop Science***, 29, 459–465, 1989.

MAJOUL, T.; CHAHED, K.; ZAMITI, E. et al. Analysis by twodimensional electrophoresis of the effect of salt stress on the polypeptide patterns in roots of a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of wheat. ***Electrophoresis***, 21, 2562–2565, 2000.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M. et al. Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. ***The Plant Journal***, 38: 982-993, 2004.

MIERNYK, J. A. Protein folding in the plant cell. **Plant Physiology**, 121:695–703, 1999.

MOLINARI, H. B. C.; et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugar cane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment chlorophyll fluorescence and oxidative. **Physiologia Plantarum**, 130:218–229, 2007. MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.239-250, 2002.

MUNNS, R. Genes and salt-tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, 3: 645–663, 2005.

NEPOMECEÑO, A.L.; STEWART, J.M.; OSTEHUIS, D.M. et al. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1407 - 1416, 2000.

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and Raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology**, 147: 1251-1263, 2008.

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; YOSHIDA, E. et al. *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. **Plant Journal**, 48: 535–547, 2006.

PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, 9: 13-37, 1999.

PANIKULANGARA, T. J.; EGGERS-SCHUMACHER, G.; WUNDERLICH, M. et al. Galactinol synthase1: a novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 136: 3148–3158, 2004.

PARIDA, A. K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environment Safety**, 60: 324-49, 2004.

PELLESCHI, S.; ROCHER, J. P.; PRIOUL, J. L. Effects of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. **Plant Cell Environment**, 20: 493–503, 1997.

PENNYCOOKE, J. C.; JONES, M. L.; STUSHNOFF, C. Down-regulating  $\alpha$ -galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. **Plant Physiology**, 133, 901–909, 2003.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, 11: 185-197, 2001.

PETERS, S.; MUNDREE, S. G.; THOMSON, J. A. et al. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 8, pp. 1947 – 1956, 2007.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M.; RICARDO, C. P. Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. **Journal of Experimental Botany**, 52, 1063–1070, 2001.

PLOMION, C.; LALANNE, C.; CLAVEROL, S. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought stress responsive proteins. **Proteomics**, 6, 6509–6527, 2006.

PUKACKA, S.; WÓJKIEWICZ, E. Carbohydrate metabolism in Norway maple and sycamore seeds in relation to desiccation tolerance. **Journal of Plant Physiology**, 159, 273–279, 2002.

QUEITSCH, C.; HONG, S. W.; VIERLING, E. et al. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 12: 479–492, 2000.

QUICK, P.; SIEGL, G.; NEUHAUS, E. et al. Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. **Planta**, 177: 535-546. 1989.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1189-1202, 2004.

REQUEJO, R.; TENA, M. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. **Phytochemistry**, 66, 1519–1528, 2005.

RICHTER, A.; HOCH, G.; OUSCHENREITER, M. et al. The role of stachyose synthase in the oligosaccharide metabolism of legume seeds. In: **Seed Biology. Advances and Applications**, Wallingford, UK, CAB International, 2000.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J. et al. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**, 134: 1683–1696, 2004.

ROTH, U.; VON ROEPENACK-LAHAYE, E.; CLEMENS, S. Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd<sup>2+</sup>. **Journal of Experimental Botany**, 57, 4003–4013, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

SARAVITZ, D. M.; PHARR, D. M.; CARTER, T. E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, 83, 185–189, 1987.

SCHRAMM, F.; GANGULI, A.; KIEHLMANN, E. et al. The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, 60, 759–772, 2006.

SEKI, M.; KAMEI, A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. et al. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion in Biotechnology**, 14, 194–199, 2003.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J. et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a fulllength cDNA microarray. **Plant Journal**, 31, 279–292, 2002.

SHINOZAKI, K.; DENNIS, E. S. Cell signalling and gene regulation: global analyses of signal transduction and gene expression profiles. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, n.5, p. 405–409, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought and cold stress. **Current Opinion in Biotechnology**, 7: 161–167, 1996.

SHINOZAKI, K. et al. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 410–417, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: difference and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 3, p. 217–223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, 6: 410–417, 2003.

SINGH, S.K.; SHARMA, H.C.; GOSWAMI, A.M. et al. In vitro growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. **Biologia Plantarum**, 43: 283–286, 2000.

SINNIAH, U. R.; ELLIS, R. H.; JOHN, P. Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica: soluble carbohydrates and heat-stable proteins. **Annals of Botany**, 82, 647–655, 1998.

SPRENGER, N.; KELLER, F. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct *galactinol synthases*. **Plant Journal**, 21, 249–258, 2000.

SCHRAMM, F.; GANGULI, A.; KIEHLMANN, E. et al. The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, 60: 759–772, 2006.

STEADMAN, K. J.; PRITCHARD, H. W.; DEY, P. M. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany**, 77: 667-674, 1996.

STEPPUHN, H.; RANEY, J.P. Emergence, height, and yield of canola and barley grown in saline root zones. **Canadian Journal of Plant Science**, 85, 815–827, 2005.

STOLF, R. **Avaliações morfo-anatômicas, ecofisiológicas e expressão gênica diferencial em duas cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**, durante períodos de déficit hídrico. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina – UEL, 2005.

SUNG, D. Y.; GUY, C. L. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. **Plant Physiology**, 132:979-987, 2003.

SWIDZINSKI, J. A.; SWEETLOVE, L. J.; LEAVER, C., J. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, 30: 431–446, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*, 3th Edition. Ad Sinauer (Ed.), Sinauer Ass Inc Publishers, Sunderland (MA), 2004.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S. et al. Important roles of drought- and coldinducible genes for *galactinol synthase* in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, 29, 417–426, 2002.

TAKANASHI, K.; SHITAN, N.; SUGIYAMA, A. et al. Galactinol synthase gene of *Coptis japonica* is involved in berberine tolerance. **Biosci Biotechnol Biochem**, 72: 398-405, 2008.

TAMURA, N.; YOSHIDA, T.; TANAKA, A. et al. Isolation and characterization of high temperatureresistant germination mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Plant & Cell Physiology**, 47: 1081–1094, 2006.

TEIGE, M.; SCHEIKL, E.; EULGEM, T. et al. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. **Molecular Cell**, 15, 141–152, 2004.

THOMAZIELLO, R. A.; FAZUOLI, L. C.; PEZZOPANE, J. R. M. et al. Café Arábica: Cultura e Técnicas de Produção. **Boletim Técnico 187**. Instituto Agrônomo de Campinas. Campinas, SP. 2000.

TOH, S.; IMAMURA, A.; WATANABE, A. et al. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, 146: 1368–1385, 2008.

TURGEON, R. Phloem loading and plasmodesmata. **Trends in Plant Science**, 1, 418–423, 1996. TURGEON, R. Recent Advances in Phloem transport and Assimilate Compartmentation, eds Bonnemain JL, Delrot S, Dainty J, Lucas WJ (Ouest Editions, Nantes, France), pp 18–22. 1991.

TURGEON, R.; McCASKILL, A. Phloem loading in *Verbascum phoeniceum* L. depends on the synthesis of raffinose family oligosaccharides. **PNAS**, v.104, n. 49, 19619-19624, 2007.

TURNER, N. C. Further progress in crop water relations. **Advances in Agronomy**, San Diego, USA, v. 58, p. 293-338, 1997.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. et al: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p. 4673-4680, 1994.

TROUVERIE, J.; THÉVENOT, C.; ROCHER, J. P. et al. The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. **Journal of Experimental Botany**, 54, 2177–2186, 2003.

VACCA, R. A.; DE PINTO, M. C.; VALENTI, D. et al. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco brightyellow 2 cells. **Plant Physiology**, 134: 1100–1112, 2004.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T: Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 9:189-195, 2006.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Journal Brazilian Plant Physiology**, v. 18, p. 95-108, 2006.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Molecular Biology**, 42: 579–620, 1991.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology** 16, 123–132, 2005.

VITÓRIA, A .P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochem.** 57:701-710, 2001.

VOLK, G. M.; HARITATOS, E.E.; TURGEON, R. *Galactinol synthase* gene expression in melon. **Journal American Society Horticultural Science**, v. 128, p. 8-15, 2003.

WALLIS, J. G.; BROWSE, J. Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. **Progress in Lipid Research**, 41: 254–278, 2002. WEIS, E., BERRY, J. A. Plants and high temperature stress. In: Long SP and Woodward FI (eds) *Plants and temperature*, pp 329-346, **Company of Biologists, Cambridge**, 1988.

WIDODO, W.; VU, J. C. V.; BOOTE, K. J. et al. Elevated growth CO<sub>2</sub> delays drought stress and accelerates recovery of rice leaf photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, 49: 259-272, 2003.

WINICOV, I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. **Annals of Botany**, London, v.82, n.6, p.703-710, 1998.

WU, C. A.; YANG, G. D.; MENG, Q. W. et al. The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter plays an important role in salt stress. **Plant Cell Physiology**, 45, 600–607, 2004.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; XHU, J. K. Cell signaling during cold, drought and salt stress. **Plant Cell (Suppl)** 14: S165–S183, 2002.

YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. **Trends Plant Sci**, 10, 615–620, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review Plant Biology**, 57: 781–803, 2006.

YAN S.; TANG Z.; SU W, SUN W. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics** 5, 235–244, 2005.

ZHAO, T. Y.; THACKER, R.; CORUM, J. W. et al. Expression of the maize. *GALACTINOL SYNTHASE* gene. family: (I) Expression of two different genes during seed development and germination. **Plant Physiology**, 2004.

ZHANG, J. Z.; CREELMAN, R. A.; ZHU, J. K. Using information from Arabidopsis to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. **Plant Physiology**, 135, 615–621, 2004.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review Plant Biology**, 53, 247–273, 2002.

ZIMMERMANN, M. H. H. ZIEGLER. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. *In* M. H. Zimmermann and J. A. Milburn [eds.], *Encyclopedia of plant physiology, New Series, vol. 1, Transport in plants 1, Phloem transport*, 480–503. Springer, New York, New York, USA, 1975.

ZUTHER, E.; BUCHEL, K.; HUNDERTMARK, M. et al. The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters** 576, 169–173, 2004. ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Sci.** 6, 66-71, 2001.

ZHU, J. K. Drought and salt stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, 53, 247–273, 2002.

ZHU, J. K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology** 6, 441–445, 2003.