



**KÁTIA FERREIRA PÔSSA**

**ABORDAGEM PROTEÔMICA DE FOLHAS DA  
CULTIVAR MUNDO NOVO (*Coffea arabica* L.)  
INDUZIDA PARA A RESISTÊNCIA À  
FERRUGEM**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**KÁTIA FERREIRA PÔSSA**

**ABORDAGEM PROTEÔMICA DE FOLHAS DA CULTIVAR MUNDO  
NOVO (*Coffea arabica* L.) INDUZIDA PARA A RESISTÊNCIA À  
FERRUGEM**

Tese apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

**LAVRAS - MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Pôssa, Kátia Ferreira.

Abordagem proteômica de folhas da cultivar mundo novo (*Coffea arabica* L.) induzida para a resistência à ferrugem / Kátia Ferreira Pôssa.  
– Lavras : UFLA, 2015.

132 p.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. Proteoma. 2. Protocolo de extração. 3. Indutor de resistência. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**KÁTIA FERREIRA PÔSSA**

**ABORDAGEM PROTEÔMICA DE FOLHAS DA CULTIVAR MUNDO  
NOVO (*Coffea arabica* L.) INDUZIDA PARA A RESISTÊNCIA À  
FERRUGEM**

Tese apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de janeiro de 2015.

Dra. Leonor Guerra Guimarães	CIFC/Portugal
Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Dr. Anderson Cleiton José	UFLA
Dr. Antônio Chalfun Júnior	UFLA
Dr. Jorge Teodoro de Souza	UFLA

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2015**

*Desde o dia 12 de março de 2014, no dia em que nasceu uma luz, é essa luz que me faz lutar e sempre querer vencer.*

*É nela que encontro forças para continuar qualquer jornada.*

**Miguel**, meu filho, todo o meu esforço é dedicado a você, forma mais singela de vida; que esta obra sirva-lhe de inspiração e que possa trazer-lhe, futuramente, a paixão pela ciência.

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, toda honra e toda glória. É Dele a vitória alcançada em minha vida!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de cursar o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por intermédio do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia do Café (INCT-Café) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas durante o doutorado.

Ao INCT-Café/CNPq, pela concessão da bolsa durante os 6 meses de doutorado-sanduíche em Portugal.

Ao orientador Mário Lúcio Vilela de Resende, pela confiança, compreensão e ensinamentos, contribuindo de forma significativa para a minha capacitação profissional.

À pesquisadora Leonor Guimarães Guerra, pela orientação, colaboração, receptividade, alegria, paciência, amizade e disposição para trabalharmos juntas.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para fazer parte da banca e contribuírem construtivamente com o este trabalho.

Ao Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), pela oportunidade, ensinamentos adquiridos e confiança. Em especial a Dra. Maria do Céu e Paula Leandro.

Ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), pela oportunidade, ensinamentos adquiridos e confiança. Em especial ao professor Dr. Pinto Ricardo, à professora Dra. Carla Pinheiro, à Dra. Inês Chaves colegas Adelaide e Isa.

A Dra. Jenny Renaut, pela identificação das proteínas deste trabalho.

À amiga Rita Tenente, indispensável para a conduta e conclusão deste doutorado.

Ao meu marido, Joel, que nunca me abandonou e deixou de viver seus sonhos para sonhar comigo. Trabalhou muito nos bastidores, para que eu pudesse vencer mais um desafio.

Aos meus pais, Vagner e Luiza, que dedicaram suas vidas à realização dos meus objetivos, me proporcionando uma vida digna e sempre se esforçando para o meu sucesso. Vocês, sem dúvida, são os meus maiores exemplos.

Ao meu pequeno Miguel que, embora seja um bebê, pôde me fazer sorrir quando eu só tinha vontade de chorar.

A minha irmã e aos meus sobrinhos, por entenderem a distância e suportarem a saudade.

Aos amigos da residência de Portugal, Maria Umbelina, Laura, Adrian, Emma, Tariq, Marta e Lima. Sem vocês nossos dias não seriam os mesmos!

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, em especial a Pedro, Camila, Josi, Ana Cristina, Deila, Eliane, Rodolfo e Fújão, e aos do Laboratório Central de Biologia Molecular, pelo companheirismo e ajuda em diversos pontos do trabalho, em especial a Brenda, Tatiana e Kalynka que, mesmo no sufoco, me ajudaram muito!

A Marluce, um doce de pessoa! E todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia.

E a todos que, de uma forma ou de outra, participaram da realização desta obra.

**MUITO OBRIGADA!**

... A resistência é o resultado de uma alma que não se conforma com o sofrimento, luta incansavelmente, superando as tribulações, vendo além das tempestades um caminho de luz e segurança. Essa alma cresce do tamanho de seus sonhos e vê nas dificuldades degraus para se alcançar a vitória almejada...

**Harold Wilson**

## RESUMO GERAL

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas do Brasil, sendo Minas Gerais o estado com maior área de cultivo, representando 54% da área total. No entanto, diversos fatores podem afetar a sua produtividade. A ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* é uma das principais doenças do cafeeiro arábica, responsável por até 50% de perdas na produção, se a doença não for controlada. O tratamento com fungicidas tem sido o principal meio de controle desta doença, porém métodos alternativos têm sido desenvolvidos, como os compostos indutores de resistência, para o manejo fitossanitário e sustentável das lavouras. Devido à importância econômica do café, algumas ferramentas biotecnológicas, como a proteômica, têm sido utilizadas para estudar esta cultura. A proteômica de plantas tem sido realizada explorando ao máximo a alta capacidade de resolução e separação das proteínas por eletroforese bi-dimensional (2-DE) em géis de poliacrilamida, seguida de identificação das proteínas por espectrometria de massa (MS). O sucesso desta abordagem depende da qualidade e reprodutibilidade das amostras de proteína extraídas. O objetivo da presente tese foi caracterizar o proteoma de folhas de *C. arabica* cv. Mundo Novo, e identificar as proteínas que diferiram na abundância após tratamento com os indutores de resistência, GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup>, e/ou a infecção com o fungo *H. vastatrix*. Os extratos proteicos das folhas foram obtidos por precipitação das proteínas em ácido tricloroacético/acetona seguido de um protocolo de purificação otimizado. Após separação das proteínas por 2-DE, os spots polipeptídicos mais abundantes e visíveis foram excisados do gel e a identificação das proteínas foi realizada utilizando a técnica de LC/MS/MS ou MALDI-TOF/TOF-MS. Foram identificadas 167 proteínas pertencentes a 55 superfamílias (NCBI), estando envolvidas em diversos processos biológicos nomeadamente; a fotossíntese, metabolismo das proteínas, estresse biótico e abiótico, redox e glicólise entre outros. Destas proteínas 65 mostraram alteração na sua abundância após o tratamento com os indutores de resistência e/ou infecção pela ferrugem. Após a pulverização com GreenForce CuCa, a maioria das proteínas identificadas, foram menos abundante, e as mais abundante estavam envolvidas no metabolismo fotossintético e estresse/defesa. Já no que se refere à pulverização com Bion<sup>®</sup> quase a metade foi mais abundante, e estavam envolvidas no metabolismo fotossintético, respiração e estresse. O perfil proteico obtido com o tratamento Bion mostrou-se mais semelhante ao da testemunha do que ao do GreenForce CuCa. Estes são os primeiros resultados obtidos ao nível do proteoma das folhas após tratamento com os indutores de resistência GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup>. Os resultados mostraram uma alteração na abundância relativa de proteínas envolvidas no metabolismo energético (fotossíntese e respiração) e estresse/defesa, o que sugere alterações ao nível do metabolismo primário das células após os tratamentos. Estes trabalhos poderão servir de ponto de partida para estudos futuros no que diz respeito à pesquisa de outras proteínas (vias metabólicas) também envolvidas na resistência induzida.

Palavras-chave: Proteoma. Protocolo de extração. Indutor de resistência. *C. arabica*.  
*H. vastatrix*.

## GENERAL ABSTRACT

Coffee is one of the most important agricultural products from Brazil, mainly in Minas Gerais, where it represents more than 54% of the national production. However, many factors can affect its productivity. Coffee leaf rust caused by the fungus *Hemileia vastatrix* is a major disease of Arabica coffee and can cause losses in productivity up to 50%, if the disease is not controlled. Fungicides are the main control to combat this disease, but alternative methods have been developed, such as inducing compounds resistance to the phytosanitary and sustainable management of crops. Due to the economic importance of coffee, some biotechnological tools such as proteomics, have been used to study this culture. The proteomic of plants has been performed taking full advantage of the high capacity of resolution and separation of proteins by bi-dimensional electrophoresis (2-DE) polyacrylamide gels, followed by identification of proteins by mass spectrometry (MS). The success of this approach depends on the quality and reproducibility of the extracted protein samples. The purpose of this thesis was to characterize leaf proteome of *C. arabica* cv. *Mundo Novo*, and identifying the differentially expressed proteins after treatment with the inducing resistance GreenForce CuCa and Bion<sup>®</sup> and/or the infection with fungal *H. vastatrix*. Protein extracts from leaves were obtained by precipitation of the proteins in the trichloroacetic acid/ acetone followed by an optimized purification protocol. After separation of proteins by 2-DE the most abundant and visible polypeptides spots were removed from the gel and the protein identification was accomplished using the technique of LC/MS/MS or MALDI-TOF/TOF-MS. One hundred sixty seven proteins have been identified belonging to 55 super families, and they are involved in several biological processes including; photosynthesis, protein metabolism, biotic and abiotic stress, redox and glycolysis among others. From these proteins 65 showed changes in their abundance after treatment with resistance inducers and/or infection by leaf rust. After spraying with GreenForce CuCa, the majority of the identified proteins were less abundant, and the most abundant were involved in photosynthetic metabolism and stress/defense. Regarding spraying with Bion<sup>®</sup> almost half was more abundant, and they were involved in photosynthetic metabolism, respiration, and stress. The protein profile obtained with the Bion treatment was more similar to the control than to the GreenForce CuCa. These are the first results obtained at the level of proteome of the leaves after treatment with the resistance inducers GreenForce CuCa and Bion<sup>®</sup>. Results showed a change in the relative abundance of proteins involved in energetic metabolism (photosynthesis and respiration) and stress/defense, suggesting alterations in the level of the primary cells metabolism after treatment. This work may serve as a starting point for future studies regarding research of other proteins (metabolic pathways) also involved in induced resistance.

**Keywords:** Proteome. Extraction protocol. Resistance inducer. *C. arabica*.  
*H. vastatrix*.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

Figura 1	Esquema do protocolo para a obtenção da amostra proteica.....	48
Figura 2	Gel 2DE corado com <i>Colloidal Coomassie Blue G-250</i> , representando as proteínas totais de folhas de cafeeiro. Os números indicados na imagem são dos spots de proteínas isolados a partir do gel e, subsequentemente, identificados por MALDI-TOF/TOF – MS (Tabela 1 - ANEXO) .....	57
Figura 4	Anotação funcional da função molecular (A), processo biológico (B) e componente celular (C) de proteínas totais de folhas de cafeeiro, analisados pelo software Blast2GO .....	60
Figura 5	Processo metabólico de proteínas totais de folhas de cafeeiro, originado pelo <i>software</i> Mercator (com base na classificação do MAPMAN).....	62

### CAPITULO 2

Figura 1	Esquema com o delineamento experimental dos tratamentos efetuados (Greenforce, Bion® e inoculação com <i>Hemileia vastatrix</i> ) e respectivos tempos de coleta (em preto, as horas após pulverização e em vermelho, as horas após inoculação com <i>H. vastatrix</i> ) das amostras de folhas de <i>C. arabica</i> Mundo Novo. Como testemunhas foram utilizadas folhas tratadas com água (T) e/ou inoculadas (T*).....	86
Figura 2	Gel 2-DE corado com <i>Colloidal Coomassie Blue G-250</i> , representando proteínas diferencialmente expressas de folhas de cafeeiro após o tratamento com indutores de resistência GreenForce CuCa ou Bion® e/ou após a inoculação com <i>H. vastatrix</i> . Os números indicados na imagem correspondem aos spots das proteínas isoladas do gel e subsequentemente identificadas por MALDI-TOF/TOF – MS (maiores detalhes, ver tabela 1).....	92
Figura 3	Anotação funcional do processo biológico das proteínas totais de folhas de cafeeiro que diferiram na abundância após os tratamentos com o indutor de resistência, utilizando os <i>softwares</i> Mercator e Blast2GO. (maiores detalhes, ver Tabela 1) .....	93
Figura 4	Nível da alteração na abundância de proteínas totais de folhas de cafeeiro após o tratamento com os indutores de resistência. Os resultados mostram as proteínas mais abundantes após	

	tratamento com o GreenForce CuCa, comparado com a testemunha e Bion®.....	94
Figura 5	Nível da alteração na abundância de proteínas totais de folhas de cafeeiro após o tratamento com os indutores de resistência. Os resultados mostram as proteínas com maior abundância após tratamento com o Bion®, comparado com a testemunha e GreenForce CuCa.....	95
Figura 6	<i>Spots</i> referente às proteínas que tiveram diferença na abundância ao longo do tempo, após a pulverização com os tratamentos (T72 x T120 e G72 x G120 e B72 x B120). <i>Spots</i> azuis diminuíram a abundância ao longo do tempo. <i>Spots</i> vermelhos aumentaram a abundância ao longo do tempo. <i>Spots</i> verdes, o aumento ou a diminuição da abundância dependem da amostra/tratamento (maiores detalhes sobre os spots, ver Tabela 1).....	97
Figura 7	Nível da alteração na abundância, quando comparados os perfis proteicos das folhas de cafeeiro pulverizadas com água (Testemunha), às 72hap e às 120hap.....	98
Figura 8	Nível da alteração na abundância, quando comparados os perfis proteicos das folhas de cafeeiro pulverizadas com GreenForce CuCa, às 72 hap e às 120 hap .....	99
Figura 9	Nível da alteração na abundância, quando comparados os perfis proteicos das folhas de cafeeiro pulverizadas com Bion®, às 72 hap e às 120 hap.....	100
Figura 10	Nível da alteração na abundância das proteínas totais de folhas de cafeeiro inoculadas e não inoculadas.....	101
Figura 11	Nível da alteração na abundância de proteínas totais de folhas de cafeeiro tratadas com o indutor de resistência Bion®, inoculadas e não inoculadas.....	102
Figura 12	Nível da alteração na abundância de proteínas totais de folhas de cafeeiro tratadas com o indutor de resistência GreenForce CuCa, inoculadas e não inoculadas.....	103

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1	Comprovação da eficiência de indutores de resistência e produtos à base de extrato vegetal no controle de fitopatógenos e/ou no aumento na atividade de enzimas de defesa.....	24
Tabela 2	Análise proteômica aplicada a grãos de café.....	30
Tabela 3	Análise proteômica aplicada à embriogênese somática, raiz e folhas do cafeeiro.....	31

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Metodologia utilizada na 1ª dimensão – focalização isoelétrica (IEF).....	51
Tabela 2	Metodologia utilizada na 2ª dimensão .....	52
Tabela 3	Anotação funcional das proteínas totais solúveis detectadas em folhas de cafeeiro .....	66

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Anotações das proteínas totais identificadas em folhas de cafeeiro.....	111
----------	---	-----

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	16
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	18
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	18
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>3.1</b>	<b>Interação <i>Coffea arabica</i> x <i>Hemileia vastatrix</i></b> .....	19
<b>3.2</b>	<b>Mecanismos de defesa das plantas</b> .....	22
<b>3.3</b>	<b>Proteômica</b> .....	26
<b>3.3.1</b>	<b>Abordagem proteômica para a compreensão da interação planta-patógeno</b> .....	28
<b>3.3.2</b>	<b>Proteômica em cafeeiro</b> .....	29
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
	<b>CAPÍTULO 2 Análise do perfil de proteínas totais de folhas do cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>) cv. mundo novo por 2-DE</b> .....	42
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	44
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
<b>2.1</b>	<b>Material vegetal e condições de crescimento</b> .....	47
<b>2.2</b>	<b>Preparação, obtenção e purificação do extrato proteico</b> .....	48
<b>2.3</b>	<b>Quantificação das proteínas</b> .....	49
<b>2.4</b>	<b>Eletroforese em gel bidimensional - 2-DE</b> .....	49
<b>2.5</b>	<b>Coloração com <i>Coomassie Blue Coloidal G-250</i></b> .....	53
<b>2.6</b>	<b>Análise dos géis</b> .....	53
<b>2.7</b>	<b>Identificação das proteínas por espectrometria de massa (MS)</b> .....	53
<b>2.8</b>	<b>Processamento adicional dos dados</b> .....	54
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>3.1</b>	<b>Otimização do protocolo de purificação dos extratos de proteínas totais para análise em gel 2-DE</b> .....	55
<b>3.2</b>	<b>Análise global das proteínas totais por 2-DE</b> .....	56
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	65
	<b>ANEXO</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
	<b>CAPÍTULO 3 Análise da alteração na abundância de proteínas de folhas de <i>C. arabica</i> cv. Mundo Novo, após o tratamento com indutores de resistência e infecção por <i>H. vastatrix</i></b> .....	79
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	81
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	84

2.1	Material vegetal e condições de crescimento .....	84
2.2	Tratamento com indutor de resistência .....	84
2.3	Obtenção do inóculo de <i>Hemileia vastatrix</i> e inoculação de cafeeiros .....	85
2.4	Preparação, obtenção e purificação do extrato proteico .....	86
2.5	Quantificação das proteínas .....	87
2.6	Eletroforese bidimensional - 2-DE .....	87
2.7	Coloração com <i>Coomassie Blue Coloidal G-250</i> .....	88
2.8	Análise dos géis .....	89
2.9	Identificação das proteínas por espectrometria de massa (MS) .....	89
2.10	Processamento adicional dos dados .....	90
3	RESULTADOS .....	91
3.1	Efeito do tratamento com indutores de resistência .....	93
3.2	Efeito dos indutores de resistência às 72hap comparado ao das 120hap .....	96
3.3	Plantas inoculadas x plantas não inoculadas .....	100
3.4	Efeito da inoculação em folhas tratadas com indutores de resistência .....	101
4	DISCUSSÃO .....	104
5	CONCLUSÕES .....	110
	ANEXO .....	111
	REFERÊNCIAS .....	117
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	123

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, respondendo por 37,8% do mercado internacional dessa *commodity* (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - OIC, 2014). Segundo o último levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2014), a safra de 2014 está estimada em 45,35 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, dos quais 32,31 milhões de sacas são de café arábica (*Coffea arabica* L.). Minas Gerais é o estado com a maior área de cultivo de café, 1,2 milhão de hectares, representando 53,26% da área total desta cultura no país (2,2 milhões de hectares).

Diversos fatores podem afetar a produtividade do cafeeiro e, dentre esses fatores, destacam-se as doenças. A ferrugem-alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br, é uma das principais doenças do cafeeiro arábica. Se a doença não for controlada e em condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, pode causar até 50% de perdas na produção no Brasil (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Seus danos são principalmente indiretos, provocados pela desfolha, o que resultará em seca dos ramos plagiotrópicos, comprometendo a produção do cafeeiro (ZAMBOLIM et al., 1997). A doença é controlada principalmente pelo uso de fungicidas (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010) que, além de contaminar o ambiente podem provocar danos para a saúde humana, e ocorrer raças resistentes do patógeno (ABRAHÃO et al., 2009; AMARAL et al., 2008). Para contornar este problema, diversos estudos têm sido realizados, com o objetivo de desenvolver métodos alternativos de controle de doenças em plantas (RESENDE et al., 2002).

A compreensão dos mecanismos de defesa do cafeeiro contra patógenos é importante para auxiliar no desenvolvimento de produtos/compostos capazes

de induzir a expressão destes mecanismos para a proteção das plantas. Nesse contexto, a utilização de compostos indutores de resistência vem sendo uma importante ferramenta para o manejo fitossanitário sustentável e integrado das lavouras. A indução de resistência ativa os mecanismos de defesa das plantas, por meio de barreiras de natureza física e/ou química, pelo tratamento com agentes bióticos ou abióticos, aumentando, assim, a resistência da planta (CAVALCANTI et al., 2004; RESENDE et al., 2004).

Devido à importância econômica do cafeeiro e a alguns problemas enfrentados por esta cultura, como as doenças, ferramentas biotecnológicas, como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, têm sido utilizadas no estudo desta espécie. A análise proteômica é uma abordagem complementar à transcriptômica e dá continuidade experimental entre a informação da sequência do genoma e o perfil da proteína de um determinado compartimento celular, célula específica ou tecido, durante o crescimento normal ou em condições de estresse (AFROZ et al., 2011; JORRIN et al., 2006; MEHTA et al., 2008).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O trabalho foi realizado com o objetivo geral de identificar proteínas potencialmente envolvidas na indução de resistência do cafeeiro a *H. vastatrix*, após os tratamentos com GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup>.

### 2.2 Objetivos específicos

Especificamente, os objetivos foram:

- a) caracterizar o proteoma da folha de *C. arabica* cv. Mundo Novo;
- b) identificar proteínas que são diferentes na abundância expressas em plantas pulverizadas com GreenForce CuCa;
- c) identificar proteínas que são diferentes na abundância em plantas pulverizadas com acibenzolar-S-metil (Bion<sup>®</sup>);
- d) comparar as diferentes proteínas abundantes em plantas pulverizadas com GreenForce CuCa e acibenzolar-S-metil (Bion<sup>®</sup>);
- e) identificar proteínas que são diferentes na abundância durante a interação compatível cafeeiro-ferrugem;
- f) comparar as proteínas diferentes na abundância em plantas suscetíveis pulverizadas com GreenForce CuCa/acibenzolar-S-metil (Bion<sup>®</sup>) e inoculadas com *H. vastatrix*;
- g) identificar possíveis proteínas candidatas a marcadores de resistência induzida, obtidas com os tratamentos GreenForce CuCa e acibenzolar-S-metil (Bion<sup>®</sup>).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Interação *Coffea arabica* x *Hemileia vastatrix*

O cafeeiro (*Coffea* spp.) pertence à família Rubiaceae e é amplamente cultivado em países tropicais. Das numerosas espécies botânicas de cafeeiro, apenas duas são cultivadas e utilizadas comercialmente em escala mundial. São elas *Coffea arabica* L., conhecida como arábica e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, conhecida como robusta, responsáveis, respectivamente, por 75% e 25% da produção brasileira (BRASIL, 2014). Segundo dados da CONAB (2014), o Brasil atingiu, na safra de 2014, produção de 45,35 milhões de sacas de 60 kg do café beneficiado. Por ser o maior produtor mundial, o país é responsável por 37,8% do mercado internacional de café (OIC, 2014).

O estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional, com produção de 22,6 milhões de sacas na safra de 2014, representando 53,26% da área total cultivada com café no país. Este estado concentra a maior área plantada, com 1.199.461 hectares, predominando a espécie arábica (98,88%) e, por isso, é considerado o primeiro, no *ranking* nacional (CONAB, 2014).

Diversos fatores podem afetar a produtividade do cafeeiro, causando perdas significativas, como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais, pragas e doenças e práticas culturais inadequadas (OESTREICH-JANZEN, 2012). Dentre as principais doenças do cafeeiro no Brasil, destacam-se a ferrugem-alaranjada, causada por *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome; a cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke; a meloidoginose, causada por *Meloidogyne* spp.; a mancha-de-phoma, causada por *Phoma tarda* (Stewart) Boerema & Bollen e a mancha-aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* Young, Dye & Wilkie, entre outras (PATRÍCIO et al., 2008; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

O fungo *Hemileia vastatrix* é o agente etiológico da ferrugem-alaranjada, que é uma das principais doenças do cafeeiro arábica, sendo um parasita biotrófico exclusivo do gênero *Coffea*. Por volta dos anos 1980, esta doença disseminou-se por toda a América.

Os sintomas da doença iniciam-se na forma de manchas cloróticas translúcidas com 1 a 3 mm de diâmetro na face inferior das folhas, podendo atingir até 1 cm de diâmetro, onde se desenvolvem massas pulverulentas de coloração amarelo-alaranjada, formadas por urediniósporos do patógeno. Na face superior das folhas aparecem áreas de tonalidade amarelada, que correspondem às regiões infectadas. Com o tempo, as lesões aumentam de tamanho, deixando em seu centro uma área necrótica, onde a esporulação é reduzida (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

A disseminação de *H. vastatrix* ocorre mais eficientemente pela ação do vento, das gotas da chuva, do escorrimento de água pelas margens do limbo foliar para a superfície abaxial e pela ação do homem durante os tratamentos culturais (GODOY et al., 1997; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Estima-se que as perdas na produção de café devido a esta doença variem de 35% a 50%, na ausência de medidas de controle (MAZZAFERA; FAZUOLI; CARVALHO, 1993; PEREIRA; SAKIYAMA, 1999; RODRIGUES; BITTENCOURT; RIJO, 1975; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

Para o controle da ferrugem do cafeeiro são recomendadas medidas gerais, tais como adubação equilibrada; plantio de linhagens resistentes ou tolerantes; fazer desbrotas, evitando o excesso de hastes e, conseqüentemente, o autossombreamento; realizar podas periódicas; adotar espaçamentos mais largos na entrelinha; evitar o cultivo sombreado; utilizar fungicidas cúpricos, como tratamento preventivo e utilizar fungicidas sistêmicos de solo e foliares do grupo dos triazóis (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). Entretanto, a utilização indiscriminada de fungicidas tem causado danos ao meio ambiente e a

seres vivos (ABRAHÃO et al., 2009; AMARAL et al., 2008). Assim, um dos maiores desafios para os pesquisadores tem sido determinar métodos eficientes de controle, de baixo impacto ambiental (SILVA et al., 2010).

Desde 1955, o Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC/IICT) centraliza, em regime de cooperação internacional, estudos sobre a variabilidade genética do fungo da ferrugem do cafeeiro, apoiando os países produtores de café em seus programas de melhoramento genético. Destes estudos resultaram descobertas relevantes, como o reconhecimento da teoria gene-a-gene, que se aplica à interação cafeeiro-*H. vastatrix*, em que foram identificados nove genes dominantes S<sub>H1</sub> - S<sub>H9</sub>; o conhecimento da diversidade genética do fungo, com 45 raças fisiológicas e o estudo da diversidade genética de cafeeiros (BETTENCOURT; RODRIGUES, 1988; NORONHA-WAGNER; BETTENCOURT, 1967; RODRIGUES; BITTENCOURT; RIJO, 1975; SILVA et al., 2006; VÁRZEA; MARQUES, 2005).

De acordo com a teoria gene-a-gene, patógenos portadores de genes de avirulência específicos (genes Avr) são reconhecidos por plantas hospedeiras portadoras de genes dominantes de resistência (R), dando origem a uma interação incompatível e não há doença. Na ausência de reconhecimento entre o produto do gene de avirulência no patógeno e/ou do gene R no hospedeiro, o patógeno é virulento e a interação é compatível, ocorrendo a doença (FLOR, 1942; GLAZEBROOK, 2005).

Silva et al. (2002) verificaram que a primeira resposta de defesa do cafeeiro à ferrugem é a reação de hipersensibilidade (HR), detectada pela autofluorescência e ou acastanhamento das células, devido à acumulação e à oxidação de compostos fenólicos. A morte celular inicia-se ao redor dos estômatos, local de penetração do fungo, estendendo-se às células subsidiárias e do mesofilo, invadidas pelo fungo, e às células adjacentes ao local de infecção. Também ocorre o encapsulamento dos haustórios com calose e celulose,

restringindo o fornecimento de nutrientes entre o hospedeiro e o fungo, o que limita seu crescimento (RIJO; VASCONCELOS, 1984; SILVA et al., 2002). O aumento da atividade das enzimas peroxidases, superóxido dismutases, lipoxigenases, fenilalanina amônia-liase, quitinases, glucanases, proteases e *germin-like protein* está correlacionado com plantas de café resistentes. Na interação compatível, algumas das respostas de defesa relatadas acima foram observadas numa fase mais tardia do processo de infecção, tornando-se, portanto, ineficazes para limitar a ação do patógeno (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2008, 2009, 2012; MAXEMIUC-NACCACHE; BRAGA; DIETRICH, 1992; ROJAS et al., 1993; SILVA et al., 2002, 2008).

### **3.2 Mecanismos de defesa das plantas**

Para escapar de patógenos, as plantas têm desenvolvido vários mecanismos de defesa constitutivos e induzidos. As respostas de defesa induzidas podem ser localizadas ou sistêmicas, as quais envolvem o reconhecimento do patógeno pela planta hospedeira, a transdução de sinais e a expressão de vários genes de defesa, que são etapas básicas do processo de sinalização desenvolvido pelas células vegetais (MONTESINOS et al., 2002). A resistência sistêmica adquirida (SAR), ou indução de resistência (IR), desenvolve-se de forma sistêmica em resposta a um patógeno que causa uma lesão ou por aplicação exógena de algum produto e, geralmente, é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e ocorre a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (RESENDE et al., 2007).

A infecção por vírus, fungos ou bactérias em várias espécies de plantas desencadeia várias reações complexas, envolvendo a ativação de um conjunto de genes que codificam diversas proteínas. Estes estresses podem induzir alterações bioquímicas e fisiológicas das plantas, tais como reforço físico da parede celular por

meio de lignificação, suberificação e deposição de calose, e produção de compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) que, subsequentemente, previnem a invasão por patógenos (EBRAHIM; SINGH, 2011).

Stuiver e Custers (2001) relataram a superexpressão dos genes que codificam para quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) em plantas transgênicas de cenoura resistentes a patógenos fúngicos. A superexpressão de proteínas PR também pode ser temporariamente induzida por eliciadores. El Ghaouth et al. (1992) correlacionaram a maior expressão de GLU à resistência de plantas de milho infectadas por *Exserohilum turcicum*. Também houve correlação entre a expressão de GLU e o aumento na indução de resistência em tomateiro pré-tratado com *Methylobacterium oryzae* e inoculado com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (INDIRAGANDHI et al., 2008). A atividade dessas enzimas também pode ser elevada nos tecidos vegetais, em resposta à pulverização de plantas com eliciadores bióticos e abióticos, conforme foi observado em cafeeiros pulverizados com óleo de citronela e acibenzolar-S-metil, aumentando a atividade de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (PEREIRA et al., 2011). Plantas transgênicas que expressam constitutivamente genes codificadores de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases exibem maior resistência a patógenos (EBRAHIM; SINGH, 2011).

Avanços nas pesquisas envolvendo a indução de resistência em plantas vêm sendo acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam menor impacto para o ambiente. A eficiência desses produtos (indutores de resistência) no controle de fitopatógenos tem sido observada em vários patossistemas, em ensaios de laboratório, em casa de vegetação e em condições de campo. Resultados promissores foram alcançados com a utilização do indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) - produto do grupo benzotriazolozole ou BTH, com o nome comercial de Bion<sup>®</sup> - e com produtos à base de formulações de extratos vegetais, destacando-se o GreenForce CuCa, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 Comprovação da eficiência de indutores de resistência e produtos à base de extrato vegetal no controle de fitopatógenos e/ou no aumento na atividade de enzimas de defesa

Tratamento	Horas após a pulverização (H.A.P)	Patossistema	Controle da severidade	Aumento na atividade enzimática	Referência
Bion <sup>®</sup>	72 h.a.p	<i>Coffea arabica</i> x <i>Hemileia vastatrix</i>	87%	Quitinase e $\beta$ -1,3-glucanase	Guzzo (2004)
Bion <sup>®</sup>	16 h.a.p	-	-	Glutaciona-S-transferase, superóxido dismutase, peroxidase e lipoxigenase	Nardi et al. (2006)
Bion <sup>®</sup>	72 h.a.p	<i>Coffea arabica</i> x <i>Hemileia vastatrix</i>	73%	-	Marchi, Borges e Resende (2002)
Bion <sup>®</sup>		<i>Coffea arabica</i> x <i>Hemileia vastatrix</i>	52%	-	Nojosa (2003)
Bion <sup>®</sup>	168 h.a.p.	<i>Coffea arabica</i> x <i>Phoma costarricensis</i>	56%	-	Nojosa et al. (2009)
EFID <sup>2</sup>	168 h.a.p.	<i>Coffea arabica</i> x Mancha de Phoma	38%	-	Amaral (2005)
EFID <sup>2</sup>	168 h.a.p.	<i>Coffea arabica</i> x <i>Phoma costarricensis</i>	37%	-	Barguil et al. (2005)
EFID <sup>2</sup>	-	<i>Coffea arabica</i> x <i>Hemileia vastatrix</i>	31%	-	Santos et al. (2007)*
EFID <sup>2</sup>	-	<i>Coffea arabica</i> x Cercosporiose	26%	Quitinases e $\beta$ -1,3-glucanases	Toyota (2008)*

Tabela 1, conclusão

Tratamento	Horas após a pulverização (H.A.P)	Patossistema	Controle da severidade	Aumento na atividade enzimática	Referência
NEFID <sup>3</sup>	72 h.a.p.	Tomate x <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	-	Quitinases e $\beta$ -1,3-glucanases, peroxidase, PR1	Medeiros et al. (2010)
NEFID <sup>3</sup>	168 h.a.p.	<i>Coffea arabica</i> x <i>Hemileia vastatrix</i>	60%	Peroxidase, $\beta$ -1,3-glucanases	Monteiro (2011)
Fitoforce <sup>4</sup>	-	<i>Coffea arabica</i> x Cercosporiose	62%	-	Costa et al. (2014)
Fitoforce <sup>4</sup>	-	<i>Coffea arabica</i> x <i>Hemileia vastatrix</i>	50%	-	Costa et al. (2014)*
GreenForce CuCa	168 h.a.p.	<i>Coffea arabica</i> x <i>Cercospora</i>	87,3%	-	Andrade et al. (2013)
GreenForce CuCa	168 h.a.p.	<i>Coffea arabica</i> x <i>Hemileia vastatrix</i>	67%	-	Monteiro et al. (2013)

<sup>1</sup> acibenzolar-S-metil (ASM)

<sup>2</sup> Extrato de folhas de café severamente infectadas por *H. vastatrix*

<sup>3</sup> Extrato de folhas de café coletadas em campo (*Coffea arabica*), a partir da superfície do solo

<sup>4</sup> Formulação à base de um subproduto da indústria do café

<sup>5</sup> Formulação composta por 60% de casca de café, acrescida de cobre e cálcio

\*Experimento em campo

### 3.3 Proteômica

O termo proteômica foi introduzido em 1995, definindo-se como o conjunto de todas as espécies de proteínas presentes em uma unidade biológica (organela, célula, tecido, órgão, indivíduo, espécie ou o ecossistema) em qualquer fase de desenvolvimento e em condições ambientais específicas (WASINGER et al., 1995; WILKINS et al., 1995).

A análise proteômica, como um complemento à análise do genoma e transcriptoma, tem demonstrado ser um método poderoso, que incorpora técnicas de alto rendimento e protocolos que permitem uma análise rápida, identificando um grande número de proteínas e tendo uma resposta mais direta aos problemas questionados nos trabalhos (FERNANDEZ; NOVO, 2012). Diferentes abordagens proteômicas podem ser utilizadas para estudar qualitativamente e quantitativamente as diferenças nas abundâncias relativas de proteínas presentes em diversas situações biológicas (AFROZ et al., 2011; MEHTA et al., 2008).

Diferentes metodologias de extração de proteínas vêm sendo testadas, sendo determinantes ao nível de qualidade da separação e de identificação de proteínas. Numa análise de eletroforese bidimensional de sementes de feijão, foram utilizados três métodos de extração diferentes, TCA-acetona, fenol e o kit comercial *clean-up*. O método utilizando fenol foi o melhor, apresentando géis com o fundo claro, com poucos riscos verticais e horizontais, facilitando a visualização dos *spots*, podendo ser identificados em até 70% (DE LA FUENTE et al., 2011).

Maldonado et al. (2008) relataram, em seu trabalho, a comparação de três protocolos de precipitação de extração de proteínas de tecido foliar de *Arabidopsis*, TCA-acetona, fenol e TCA-acetona-fenol, não tendo encontrado diferença significativa na quantidade de proteínas entres estes métodos, apesar de o método com TCA-acetona ter proporcionado o melhor resultado em termos

de focalização e intensidade dos spots, reprodutibilidade e detecção de spots exclusivos.

A utilização simultânea de mercaptoetanol e ditioneitol na extração de proteínas de folhas e raízes de soja, pelo método de TCA-acetona, melhorou a resolução dos géis 2-DE, o que permitiu a identificação de 122 proteínas (MESQUITA et al., 2012).

Para a análise quantitativa, a comparação das intensidades dos *spots* de proteína em diferentes géis é realizada utilizando-se *softwares* específicos, que são capazes de analisar vários géis 2-DE, normalizar os volumes dos spots e realizar a análise estatística diferencial (CARLI; BENVENUTO; DOMINI, 2012). Ao concluir a etapa de análise do gel, os spots de interesse são isolados do gel e, em seguida, é realizada uma hidrólise enzimática das proteínas com tripsina ou semitripsina. Em seguida, os peptídeos são identificados por espectrometria de massas, sendo a técnica mais usada para esta finalidade denominada *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) (SOARES et al., 2012).

A análise do proteoma de plantas não modelo tem sido realizada explorando ao máximo a alta capacidade de resolução e separação das proteínas por eletroforese bi-dimensional (2-DE) em géis de poliacrilamida, em combinação com a análise multivariada dos dados e a identificação dos *spots* por espectrometria de massa (MS) (CARPENTIER et al., 2008). Essa análise, complementada por sequenciamento *de novo*, possibilita a identificação inequívoca das proteínas e dos mecanismos metabólicos envolvidos em diferentes funções.

O sequenciamento dos peptídeos por *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS-MS) é outro método para identificação das proteínas e, neste caso, as proteínas são separadas por *high performance/pressure liquide chromatography* (HPLC) e o processo e a ionização ocorrem por *electrospray ionization* (ESI), à medida que os peptídeos são eluídos (PROTTECH, 2013).

### 3.3.1 Abordagem proteômica para a compreensão da interação planta-patógeno

Os estudos da proteômica nas interações planta-patógeno ainda são escassos, principalmente sob a associação planta-fungo. Estes estudos têm identificado numerosas proteínas envolvidas em vários processos biológicos, incluindo a defesa, a resposta ao estresse, a transdução de sinal, a fotossíntese e o transporte de elétrons (AFROZ et al., 2011).

De Wit, Buurlage e Hammond (1986), ao estudarem a interação *Cladosporium fulvum* x tomateiro, conseguiram caracterizar o primeiro produto do gene de avirulência (Avr9), após purificação de fluidos apoplásticos do tomate por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido por HPLC de fase inversa e sequenciamento pelo método de Edman.

A abordagem proteômica foi utilizada no estudo de diferentes interações *Medicago truncatula* x *Uromyces striatus* (compatíveis e incompatíveis). A comparação do perfil das proteínas de folhas de *M. truncatula* infectadas e não infectadas permitiu identificar diferentes proteínas, a maioria das quais está envolvida na produção de energia e no mecanismo de defesa, durante os estágios iniciais da infecção (CASTILLEJO et al., 2010). Franco et al. (2010) também utilizaram esta técnica, a fim de otimizar o protocolo de extração de proteínas na cultura do arroz e café, para compreender a expressão de proteínas totais quando estas culturas (resistentes) eram desafiadas pelos fitonematóides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita*. Os autores mostram, neste trabalho, a importância de definir bem a metodologia aplicada e que, para cada tipo de tecido, uma diferente combinação das técnicas deve ser utilizada, podendo ser estendidas para outras espécies de plantas, pois fornecem informações valiosas na interação raiz x nematoide.

### **3.3.2 Proteômica em cafeeiro**

Em cafeeiro, a análise proteômica vem sendo aplicada majoritariamente no estudo de diferentes aspectos do grão, para o controle de qualidade da bebida (Tabela 3) e, em menor escala, na análise do processo embriogênico, no estudo da raiz e de folhas (Tabela 4).

Tabela 1 Análise proteômica aplicada a grãos de café

OBJETIVO	REFERÊNCIA
Comparação do perfil 2-DE de sementes verdes de duas espécies de cafeeiro	Gil-Agusti et al. (2005)
Modificações observadas em embriões zigóticos em diferentes estágios de desenvolvimento da semente	Franco et al. (2009) e Koshino et al. (2008)
Comparação entre fases de desenvolvimento dos frutos pré-maturação	Bandil et al. (2013)
Composição do pericarpo de frutos verdes de diferentes genótipos de cafeeiro	Forero e Moncada (2014)
Identificação de proteínas que atuam como fonte de nitrogênio durante a torrefação, garantindo sabor e aroma ao café	Montavon, Mauron e Duruz (2003)
Estudo do perfil proteômico diferencial da interação entre três diferentes genótipos cultivados em dois ambientes, a fim de relacioná-los com a qualidade de bebida	Mendonça (2012)
Avaliação da composição proteica de grãos de diferentes cultivares de café, submetidos a diferentes processamentos e cultivados em diferentes faixas de altitudes	Livramento (2014)

Tabela 2 Análise proteômica aplicada à embriogênese somática, raiz e folhas do cafeeiro

OBJETIVO	REFERÊNCIA
Análise do perfil das proteínas extracelulares durante o processo de embriogênese somática em <i>Coffea</i> spp.	López et al. (2012) e Tonietto et al. (2012)
Estudo da variação do proteoma de raiz e folhas de cafeeiro em estresse abiótico e biótico	Costa (2014), Guerra-Guimarães et al. (2012, 2014), Marraccini et al. (2012) e Ramos et al. (2007)

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, A. A. et al. Influência de safras agrícolas e tratamentos fungicidas no café cereja descascado e bóia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1919-1925, 2009. Especial.
- AFROZ, A. et al. Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, p. 745-763, 2011.
- AMARAL, D. R. et al. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 425-431, 2008.
- AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- ANDRADE, C. C. L. et al. Formulação a base de subprodutos da cafeicultura no controle da cercosporiose do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 46., 2013, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: [s. n.], 2013. 1 CD ROM.
- BANDIL, G. B. et al. Comparative proteomic analysis between early developmental stages of the *Coffea arabica* fruits. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 5102-5110, 2013.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry huskson *Phoma costaricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 535-537, 2005.
- BETTENCOURT, A. J.; RODRIGUES, J. R. C. J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. London: Elsevier, 1988. p. 199-234.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

CARLI, M. D.; BENVENUTO, E.; DOMINI, M. Recent insights into plant-virus interactions through proteomic analysis. **Journal Proteome Research**, Washington, v. 11, p. 4765-4780, 2012.

CARPENTIER, S. C. et al. Proteome analysis of non-model plants: A challenging but powerful approach. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 27, p. 354–377, 2008.

CASTILLEJO, M. A. et al. Two-dimensional gel electrophoresis-based proteomic analysis of the *Medicago truncatula*–rust (*Uromyces striatus*) interaction. **Annals of Applied Biology**, London, v. 157, p. 243–257, 2010

CAVALCANTI, F. R. et al. Natural extracts induce lignification on cocoa and tomato leaves. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 107.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: quarto levantamento**. Brasília, 2014. 51 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_12\\_22\\_09\\_53\\_55\\_boletim\\_dezembro\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_12_22_09_53_55_boletim_dezembro_2014.pdf)>. Acesso em: 11 jan. 2015.

COSTA, B. H. et al. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, p. 635–642, 2014.

COSTA, T. S. **Análise do perfil transcriptômico e proteômico de raízes de diferentes clones de *Coffea canephora* em condições de déficit hídrico**. 2014. 238 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

DE LA FUENTE, M. et al. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 262-267, 2011.

DE WIT, P. J. G. M.; BUURLAGE, M. B.; HAMMOND, K. E. "The occurrence of host-, pathogen- and interaction-specific proteins in the apoplast of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) infected tomato leaves". **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, n. 2, p. 159-172, 1986.

EBRAHIM, S.; SINGH, K. U. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: MÉNDEZVILAS, A. (Ed.). **Science against microbial pathogens: advances**. Extremadura: Formatex Research Center, 2011. v. 1, p. 1043-1054.

EL GHAOUTH, A. et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 398-402, 1992.

FERNANDEZ, R. G.; NOVO, J. V. J. Contribution of Proteomics to the Study of Plant Pathogenic Fungi. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 11, p. 3-16, 2012.

FLOR, H. H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 32, p. 653-669, 1942.

FORERO, C. P. B.; MONCADA, M. P. Proteomic analysis of *Colletotrichum kahawae*-resistant and susceptible coffee fruit pericarps. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 138, p. 307-321, 2014.

FRANCO, O. L. et al. Methodological evaluation of 2-DE to study root proteomics during nematode infection in cotton and coffee plants. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, New York, v. 40, p. 152-163, 2010.

FRANCO, O. L. et al. Proteomic evaluation of coffee zygotic embryos in two different stages of seed development. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 47, p. 1046-1050, 2009.

GIL-AGUSTI, M. T. et al. Two-dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 710-718, Feb. 2005.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

GODOY, C. V. et al. **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1997. v. 2.

GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to Orange rust *Hemileia vastatrix*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, p. 702-706, 2009.

GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Differential induction of superoxide dismutase in *Coffea arabica* – *Hemileia vastatrix* interactions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 22., 2008, Campinas. **Proceedings...** Campinas: ASIC, 2008. p. 14-19.

GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Effect of greenhouse conditions on the leaf apoplastic proteome of *Coffea arabica* plants. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 104, p. 128-139, 2014.

GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Integrated cytologic and proteomic analysis of *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 24., 2012. San Jose. **Proceedings...** San Jose: ASIC, 2012. p. 11-16.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

INDIRAGANDHI, P. I. et al. Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Journal Microbiology Biotechnology**, Seoul, v. 24, p. 1037-1045, 2008.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Disponível em: <<http://dev.ico.org/prices/ml.htm>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

JORRIN, J. V. et al. Proteomics: a promising approach to study biotic interaction in legumes. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, p. 37-47. 2006.

KOSHINO, L. L. et al. Comparative Proteomical Analysis of Zygotic Embryo and Endosperm from *Coffea arabica* Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 10922–10926, 2008.

LIVRAMENTO, K. G. **Proteômica comparativa da interação genótipo, ambiente e processamento de grãos de café arábica**. 2014. 97 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LÓPEZ, H. G. M. et al. Evaluation of the Extracellular Proteome Profile During the Somatic Embryogenesis Process of *Coffea spp.* **Journal of the Mexican Chemical Society**, México, v. 56, n. 1, p. 72-79, 2012.

MALDONADO, A. M. et al. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 71, n. 4, p. 461-472, 2008.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V. Proteção induzida por benzotriazolone contra Ferrugem-Alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1103-1106, set./out. 2002.

MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 11, p. 4191-4212, 2012.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C. Chitinase -1,3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 15, p. 145-150, 1992.

MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L. C.; CARVALHO, A. Ploidy and resistance of *Coffea arabica* and related species to coffee rust. **Journal of Genetics & Breeding**, Rome, v. 47, p. 267-270, 1993.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 30, p. 1-9, 2010.

MEHTA, A. et al. Plant-pathogen interactions: what is proteomic telling us. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 275, p. 3731-3746, 2008.

MENDONÇA, L. M. C. **Análise do perfil transcriptômico e proteômico de raízes de diferentes clones de *Coffea canephora* em condições de déficit hídrico**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MESQUITA, R. O. et al., Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: Improvements in identification of new and low-abundance proteins. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 1, p. 353-361, 2012. Suppl.

MONTAVON, P.; MAURON, A. F.; DURUZ, E. Changes in green coffee protein profiles during roasting. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 2335-2343, 2003.

MONTEIRO, A. C. A. **Associação de indutores de resistência para o manejo da ferrugem do cafeeiro e análise bioquímica da resposta de defesa induzida**. 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2011.

MONTEIRO, A. C. A. et al. **Fosfitos e formulações à base de subprodutos das indústrias de café e da lavoura de citros no manejo da ferrugem do cafeeiro**. 2013. Disponível em: <[http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb\\_anais/205.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/205.pdf)>. Acesso em: 13 fev. 2014.

MONTESINOS, E. Pathogenic plant–microbe interactions. What we know and how we benefit. **International Microbiology**, Barcelona, v. 3, p. 69–70, 2002.

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, p. 1594–1605, 2006.

NOJOSA, G. B. A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arábica* L. a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. e *Phoma costarricensis* Echandi**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 60-62, 2009.

NORONHA-WAGNER, M.; BETTENCOURT, A. J. Genetics and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 45, p. 2021-2031, 1967.

OESTREICH-JANZEN, S. **Chemistry of coffee in comprehensive natural products II: chemistry and biology, the science of coffee**, illy. 2012. Disponível em: <<http://www2.illy.com/wps/wcm/connect/us/illy/>>. Acesso em: 6 jul. 2014.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, London, v. 152, n. 1, p. 29-39, 2008.

PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N. S. Melhoramento genético do cafeeiro visando resistência às doenças. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras. UFLA, 1999. p. 117-140.

PEREIRA, R. B. et al. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 115-123, jan./fev. 2011.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. 215 p.

PROTTECH. **Two different methods in protein identification by mass spectrometry**. Disponível em: <[http://www.prottech.com/Technologylid\\_2\\_1.pdf](http://www.prottech.com/Technologylid_2_1.pdf)>. Acesso em: 4 ago. 2013.

RAMOS, H. J. O. et al. Análise proteômica do estresse hídrico em cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Embrapa Café, 2007. 1 CD ROM.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: Denmark, 2004. p. 79.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, 2002.

RESENDE, M. L. V. et al. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 507-511, 2007.

RIJO, L.; VASCONCELOS, M. I. Formação de calose e lenhina em combinações incompatíveis *Coffea* spp. – *Hemileia vastatrix*. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO, 1983, Oeiras. **Anais...** Oeiras: [s. n.], 1984. p. 269-279.

RODRIGUES, J. C. J.; BITTENCOURT, A. J.; RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 49-70, 1975.

ROJAS, M. L. et al. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 43, p. 209-219, 1993.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 11-16, jan./fev. 2007.

SILVA, M. B. et al. Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas. In: VENZON, M.; JÚNIOR, T. J. P.; PALLINI FILHO, A. (Coord.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2010. p. 33-54.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, p. 119-147, 2006.

SILVA, M. C. et al. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 169-183, 2002.

SILVA, M. C. et al. Involvement of peroxidases in the hypersensitive reaction of coffee (*Coffea arabica*) plants to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, p. 29-38, 2008.

SOARES, T. C. B. et al. Princípios básicos em proteômica vegetal. In: DIRCEU PRATISSOLI, D. et al. **Tópicos especiais em produção vegetal III**. Alegre: UFES, 2012. 837 p.

STUIVER, M. H.; CUSTERS, J. H. H. V. Engineering disease resistance in plants. **Nature**, London, v. 411, p. 865-868, jun. 2001.

TONIETTO, A. et al. Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 30, p. 1393-1399, 2012.

TOYOTA, M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VÁRZEA, V. M. P.; MARQUES, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 53-74.

WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, n. 7, p. 1090-1094, 1995.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 13, p. 19-50, Dec. 1995.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: RIBEIRO DO VALE, F. X.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. v. 1, p. 83-180.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*C. arábica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 165-180.

## CAPÍTULO 2

### ANÁLISE DO PERFIL DE PROTEÍNAS TOTAIS DE FOLHAS DO CAFEIEIRO

(*Coffea arabica*) cv. MUNDO NOVO POR 2-DE

#### RESUMO

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas do Brasil e, devido a isso, algumas ferramentas biotecnológicas, como a proteômica, têm sido utilizadas para estudar esta cultura. A proteômica de plantas tem sido realizada explorando ao máximo a alta capacidade de resolução e separação das proteínas por eletroforese bi-dimensional (2-DE) em géis de poliacrilamida, assim como a análise dos *spots* por espectrometria de massa (MS). Porém, esta abordagem depende do sucesso da extração de proteínas, utilizando um protocolo reprodutível. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer o proteoma das proteínas totais solúveis de folhas de *C. arabica* cv. Mundo Novo. Os extratos proteicos foram obtidos por precipitação em ácido tricloroacético/acetona e, em seguida, foi feita a otimização do protocolo de purificação das amostras. Após separação das proteínas por 2-DE, os *spots* polipeptídeos mais abundantes e visíveis foram excisados do gel e a sua identificação foi realizada, utilizando a técnica de MALDI-TOF/TOF-MS. Foram identificadas proteínas em 167 *spots*, 37 dos quais com mais do que uma identificação significativa. As proteínas identificadas estão envolvidas em diversos processos biológicos, nomeadamente na fotossíntese, no metabolismo das proteínas, no estresse biótico e abiótico, redox e glicólise entre outros. A presença de várias proteínas de estresse (biótico, abiótico e redox) sugere a existência de um mecanismo de defesa constitutivo nas folhas saudáveis de cafeeiro. A caracterização do proteoma da folha saudável do cafeeiro ajudará em estudos futuros com plantas crescidas em diferentes ambientes e tipos de estresses.

Palavras-chave: Proteoma. Protocolo de extração. 2-DE. MALDI-TOF/TOF-MS.

**PROFILE ANALYSIS OF THE TOTAL PROTEIN OF COFFEE LEAVES  
(*Coffea arabica*) cv. *MUNDO NOVO* by 2-DE**

**ABSTRACT**

Coffee is one of the most valuable agricultural products in Brazil. Because of this, biotechnological tools, such as proteomics, have recently been used to study this crop. The proteomic of plants has been performed taking full advantage of the high capacity of resolution and separation of proteins by bi-dimensional electrophoresis (2-DE) polyacrylamide gels, as well as spots analysis by mass spectrometry (MS). However, this approach depends on the success of protein extraction using a reproducible protocol. This study aimed to establish the proteome of total soluble protein from leaves of *Coffea arabica* cv. *Mundo Novo*. Protein extracts were obtained by precipitation in the trichloroacetic/acetone and then was made optimization of the samples purification protocol. After separation of proteins by 2-DE the most abundant and visible polypeptides spots were removed from the gel and their identification was accomplished using the technique of MALDI-TOF/TOF-MS. It has been identified proteins in one hundred sixty seven spots, which thirty seven with more than a significant identification. The identified proteins are involved in numerous biological processes, including photosynthesis, protein metabolism, biotic and abiotic stresses, redox and glycolysis, among others. The presence of several stress proteins (biotic, abiotic and redox), suggests the existence of a constitutive defense mechanism in healthy coffee leaves. The proteome characterization of the healthy leaf of coffee will help in future studies with plants grown in different environments and stresses.

Keywords: Proteome. Extraction protocol. 2-DE. MALDI-TOF/TOF-MS.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, respondendo por 37,8% do mercado internacional dessa *commodity* (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - OIC, 2014). Segundo o último levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2014), a safra de 2014 está estimada em 45,35 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, dos quais 32,31 milhões de sacas são de café arábica. Minas Gerais é o estado com a maior área de cultivo de café, 1,2 milhão de hectares, representando 53,26% da área total desta cultura no país (2,2 milhões de hectares).

Devido à importância econômica do cafeeiro, ferramentas biotecnológicas, como genômica, transcritômica, proteômica e metabolômica, têm sido utilizadas no estudo desta cultura. A análise proteômica é uma abordagem complementar à transcritômica e permite a continuidade experimental entre a informação da sequência do genoma e o perfil da proteína de um determinado compartimento celular, célula específica ou tecido, durante o crescimento normal ou em condições de estresse (AFROZ et al., 2011; JORRIN et al., 2006; MEHTA et al., 2008).

A análise do proteoma de plantas não modelo, assim como o cafeeiro, tem sido realizada explorando ao máximo a alta capacidade de resolução e separação das proteínas por eletroforese bi-dimensional (2-DE) em géis de poliacrilamida, em combinação com a identificação dos *spots* polipeptídicos por espectrometria de massa (MS) (CARPENTIER et al., 2008). No entanto, o sucesso desta abordagem depende de uma eficiente e reproduzível extração das proteínas, onde seja possível, idealmente, capturar todos os tipos de proteínas de um proteoma, com baixa contaminação de outras moléculas (WANG; TAI; CHEN, 2008). Nas células vegetais, os compostos que interferem na quantidade e na qualidade das proteínas extraídas são os sais, os ácidos nucleicos, as enzimas proteolíticas e oxidativas, os polissacarídeos e os

compostos fenólicos, entre outros. Assim, é necessário aperfeiçoar e adaptar os protocolos de extração e purificação das proteínas em função da espécie/tecido vegetal em estudo (JELLOULI et al., 2010).

Em cafeeiro, a análise proteômica vem sendo aplicada, majoritariamente, no estudo de diferentes aspectos da semente, tais como comparação do perfil 2-DE de sementes verdes de duas espécies de cafeeiro (GIL-AGUSTI et al., 2005); modificações observadas em embriões zigóticos em diferentes estágios de desenvolvimento da semente (FRANCO et al., 2009; KOSHINO et al., 2008); comparação entre fases de desenvolvimento dos frutos pré-maturação (BANDIL et al., 2013); composição do pericarpo de frutos verdes de diferentes genótipos de cafeeiro (FORERO; MONCADA, 2014); identificação de proteínas que atuam como fonte de nitrogênio durante a torrefação, garantindo sabor e aroma ao café (MONTAVON; MAURON; DURUZ, 2003); estudo do perfil proteômico diferencial da interação entre três diferentes genótipos cultivados em dois ambientes, a fim de relacioná-los com a qualidade de bebida (MENDONÇA, 2012) e avaliação da composição proteica de grãos de diferentes cultivares, submetidos a diferentes processamentos e cultivados em diferentes faixas de altitudes (LIVRAMENTO, 2014),

A proteômica foi também aplicada, em menor escala, na análise do perfil das proteínas extracelulares durante o processo de embriogênese somática em *Coffea* spp. (LÓPEZ et al., 2012; TONIETTO et al., 2012) e no estudo da variação do proteoma de raiz e de folhas de cafeeiro em estresse abiótico (COSTA, 2014; GUERRA-GUIMARÃES et al., 2014; MARRACCINI et al., 2012; RAMOS et al., 2007) e biótico (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2012). Nestes trabalhos, foram utilizadas diferentes espécies e/ou genótipos de cafeeiro e diferentes metodologias de extração de proteínas, em função dos objetivos pretendidos e do tecido vegetal estudado.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer o mapa proteômico anotado das proteínas totais de folhas de *C. arabica* cv. Mundo Novo, por meio da extração de proteínas por precipitação em TCA/acetona, ressuspensas em tampão com SDS e purificadas. A identificação dessas proteínas poderá ser utilizada como referência, em trabalhos futuros, para a compreensão de mecanismos de respostas desta planta a diferentes condições de estresse biótico/abiótico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras/Portugal.

### 2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Para a formação de mudas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo, pertencentes à linhagem 379/19, as sementes foram adquiridas da Estação Experimental da Epamig, Centro Tecnológico do Sul de Minas, Lavras, MG.

As sementes foram germinadas em areia lavada e, assim que atingiram a fase orelha de onça, foram transplantadas para sacos de polietileno de 0,50 L contendo substrato composto por solo e areia, na proporção 3:1 (v/v), acrescido de fertilizante 4:14:8 e superfosfato simples. Após cinco meses de crescimento, as plantas foram irrigadas apenas uma vez com 30 mL de uma solução nutritiva por muda, contendo, em mg L<sup>-1</sup>, 192 de KCl, 104,42 de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150,35 de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 61 de ureia, 0,27 de NH<sub>4</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,61 de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 6,67 de ZnSO<sub>4</sub>, 1,74 de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 4,10 de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 4,08 de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 5,58 de EDTA bissódico.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia da UFLA, com variação de temperatura entre 18 a 27 °C, sendo irrigadas diariamente. Ao atingir cinco pares de folhas totalmente expandidas, com cerca de seis meses de idade, as plantas foram transferidas para uma câmara climatizada tipo Fitotron (Eletrolab – São Paulo, Brasil), em condições controladas de temperatura (24 °C) e fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente, 30 dias antes do início do experimento para aclimação às condições ambientais do ensaio.

## 2.2 Preparação, obtenção e purificação do extrato proteico

Dois pares de folhas jovens totalmente expandidas e sadias foram coletados e a extração de proteínas totais foi realizada seguindo o método de precipitação com 10% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA)/acetona contendo 0,07% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol, baseado no protocolo descrito por Damerval et al. (1986) (Fig. 1). A coleta foi realizada no mês de fevereiro do ano de 2013.

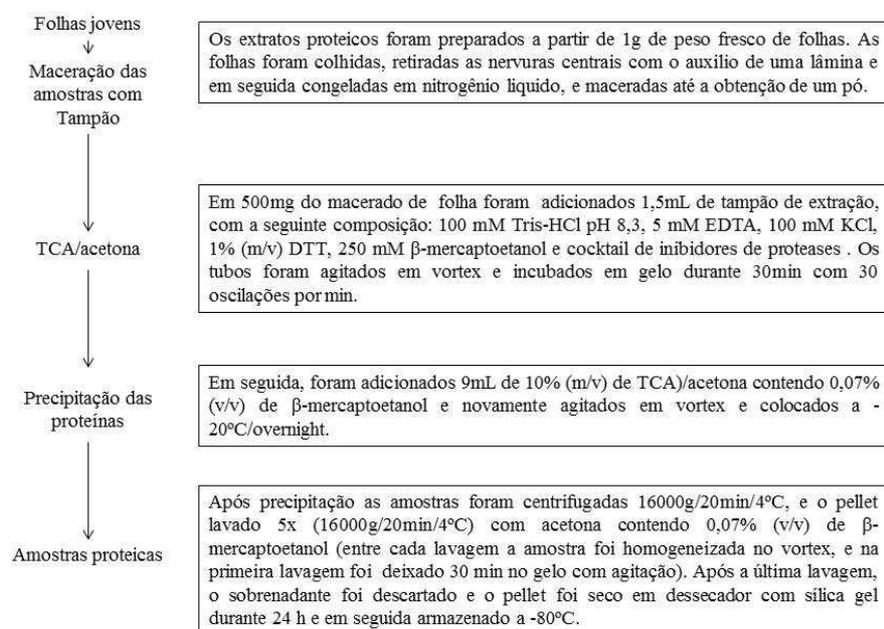


Figura 1 Esquema do protocolo para a obtenção da amostra proteica

Trinta microgramas de amostra proteica (pellet) foram ressuspensos em 750  $\mu$ L de duas soluções tampão distintas, de modo a avaliar a capacidade de solubilização das proteínas do pellet: tampão I) 30mM Tris-HCl pH8,5, 7M ureia, 2M tiourea e 4% CHAPS e tampão II) 2% SDS; 30 mM Tris-HCl pH 8,8

e 50 mM DDT. A solubilização das proteínas foi realizada por agitação primeiro no vortex (1 minuto) e, depois, em movimentos oscilatórios (25 osc/min), durante 2 horas (com agitação no vortex a cada 30 minutos). As amostras foram posteriormente centrifugadas a 12.000 g/15 min, de modo a obter um sobrenadante limpo.

Os extratos proteicos foram, em seguida, purificados para eliminar as substâncias interferentes (detergentes, sais, lipídeos, compostos fenólicos e ácidos nucleicos). Para isso, utilizaram-se dois métodos distintos: coluna *PD SpinTrap™ G-25* (GE Healthcare) e *2D Clean-up Kit* (GE Healthcare). Estes métodos foram avaliados individualmente ou associados. Após a purificação, os extratos proteicos foram guardadas em tampão 30 mM Tris-HCl pH 8,3, 7 M ureia, 2M tiourea e 4% CHAPS, a -80 °C, até serem utilizadas.

### **2.3 Quantificação das proteínas**

A quantificação da concentração proteica das diferentes amostras foi estimada pelo método de Bradford, adaptado para placas de ELISA e modificado por Ramagli (1999) para 2-DE, usando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). A absorbância foi medida, a 595 nm, em espectrofotômetro de ELISA (modelo UVM340). As análises foram realizadas em triplicata, tanto para os pontos da reta de calibração como para as amostras. A concentração da proteína nas amostras foi determinada a partir da reta padrão ( $R^2 \geq 0,98$ ), linear para uma gama de proteínas entre 1-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **2.4 Eletroforese em gel bidimensional - 2-DE**

A análise das amostras foi realizada por eletroforese em gel bidimensional (2-DE). Para a focalização isoeletrica (1ª dimensão), utilizou-se o

equipamento *IPGphor Ettan IEF* e *Immobiline IPG DryStrips* (GE Healthcare) e, na 2ª dimensão, as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% (m/v) com diferentes dimensões.

Para a definição do protocolo de extração, purificação e 2-DE, foi necessário realizar alguns testes preliminares. A avaliação da qualidade do perfil das proteínas foi realizada, inicialmente, num gel 2-DE de 7 cm, em faixa de pH 3-10. Após a obtenção deste perfil, os testes seguintes foram realizados em géis de 13 cm com uma faixa de pH 4-7. Após a definição do melhor protocolo de extração e purificação das amostras, utilizou-se, para a caracterização do proteoma das folhas, géis com 18 cm e uma faixa de pH 4-7 (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 Metodologia utilizada na 1ª dimensão – focalização isoeétrica (IEF)

Tiras		Quantidade de proteínas (µg)	IPG buffer (µL)	DeStreak (µL)	Condições da corrida IEF*
Tamanho	pH				
7 cm	3-10	60	1,25	2	100 V – 2h – <i>Step –n–hold</i> ; 30 V- 10h – <i>Step-n–hold</i> ; 200 V – 10 min – <i>Step – n – hold</i> ; 3500V - 1h30min – Gradiente; 3500 V – 5500v/hr – <i>Step – n – hold</i> ; 100V- 12h – <i>Step-n–hold</i>
13 cm	4-7	100	1,25	4	100 V – 2h – <i>Step n– hold</i> ; 30 V - 10h – <i>Step – n - hold</i> ; 250 V – 250 V/h – <i>Step –n – hold</i> ; 500 V – 750 V/h – <i>Step –n – hold</i> ; 1000 V – 1500V/h – <i>Step –n – hold</i> ; 2.500 V – 2.500 V/h – <i>Step –n – hold</i> ; 8.000 V - 4h – Gradiente; 8.000 V – 40.000 V/h – <i>Step –n – hold</i> ; 100 V – 7h – <i>Step –n – hold</i> .
18 cm	4-7	300	1,25	4	100 V – 2h – <i>Step –n–hold</i> ; 30 V- 10h – <i>Step-n–hold</i> ; 150 V – 3h – <i>Step – n – hold</i> ; 300 V – 3h – <i>Step – n – hold</i> ; 1.000 V – 6h – Gradiente; 1.000 V – 1h – <i>Step – n – hold</i> ; 8.000 V – 4h – Gradiente; 8.000 V – 3.200 V/hr – <i>Step – n – hold</i> ; 100 V- 18h – <i>Step-n–hold</i>

\* A corrida foi realizada a 20 °C, com uma corrente de 50 µA por tira e de acordo com os diferentes protocolos. Após a corrida, as tiras foram armazenadas a -20 °C, até o uso

Tabela 2 Metodologia utilizada na 2ª dimensão

Tamanho do gel	Tampão de equilíbrio*		Tipo de gel	Aparelho de eletroforese	Condições da eletroforese
	DTT** 1% (p/v)	Iodoacetamida** 2,5% (p/v)			
7 cm	2,5 mL	2,5 mL	12,5% (m/v) de poliacrilamida contendo SDS	Mini Protean Tetra Cell (BIO-RAD)	Desnaturante, a 20 °C, com uma corrente de 10 mA por gel nos primeiros 15 minutos e de 20 mA por gel até ao fim da corrida (cerca de 1h30min a 2h).
13 cm	5 mL	5 mL	12,5% (m/v) de poliacrilamida contendo SDS	Hoefer SE 600 Ruby (GE Healthcare),	Desnaturante, a 20 °C, com uma corrente de 10 mA por gel, nos primeiros 15 min e de 20 mA por gel, até ao fim da corrida (aproximadamente 5h).
18 cm	7,5 mL	7,5 mL	gel de poliacrilamida DALT GEL 12.5% (GE Healthcare)	Ettan DALT six (GE Healthcare)	Desnaturante, a 25 °C, com uma potência total 1,5 W por gel, até o fim da corrida (aproximadamente 22 horas).

\* 50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6M ureia; 30% glicerol; 2% SDS; azul de bromofenol

\*\*Em agitação 15 minutos à temperatura ambiente

## 2.5 Coloração com Coomassie Blue Coloidal G-250

Os géis foram fixados em solução contendo 10% de ácido acético e 40% de etanol, por um período mínimo de 30 minutos. Em seguida, esta solução foi descartada e os géis foram colocados em solução aquosa de azul de Coomassie coloidal, composta por *Coomassie Blue G-250* 0,1% (m/v), sulfato de amônia 10% (m/v), ácido fosfórico 1,2% (v/v) e metanol 20% (v/v), para corar, durante 7 dias, seguindo protocolo da GE Healthcare, modificado por Neuhoﬀ et al. (1988). Antes da aquisição da imagem (Image Scanner I GE Healthcare), os géis foram lavados duas vezes com água destilada para retirar o resíduo do corante.

## 2.6 Análise dos géis

Utilizou-se o *software* de análise de imagens de géis 2D, *Progenesis Same Spot 2D software v.s. 4.5* (Nonlinear Dynamics, Waters), para selecionar o gel com maior número de *spots* e com melhor qualidade para ser padrão de referência, sendo este utilizado para alinhar todos os géis do ensaio. O alinhamento dos *spots* dos géis garantiu que o *match* (ajuste) entre todos os géis do experimento fosse máximo. Os *spots* foram ainda sujeitos a confirmação visual (filtragem) e o seu volume normalizado conforme o algoritmo do *Progenesis Same Spot 2D software*.

## 2.7 Identificação das proteínas por espectrometria de massa (MS)

Após análise das imagens, os *spots* mais abundantes e visíveis foram excisados manualmente dos géis e colocados numa microplaca de sequenciamento com 96 poços. As microplacas foram enviadas para o *Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann* (Luxemburgo), para a identificação dos polipeptídeos por espectrometria de massa (MS), pela técnica de MALDI-TOF/TOF-MS (*matrix*

*assisted laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry*). O cruzamento da informação das massas dos polipeptídeos obtidas por MS com a informação disponível em bases de dados genômicas (NCBI e *ESTCoffee*) permitiu identificar as proteínas. Esta etapa do trabalho foi realizada pela Dr.<sup>a</sup> Jenny Renaut, responsável da plataforma de Proteômica do CRP-Gabriel Lippmann.

A espectrometria de massa foi realizada utilizando-se o MALDI-TOF/TOF e MS/MS para determinar e comparar as massas de peptídeos geradas por digestão com tripsina. Os parâmetros utilizados foram: **modificação fixa**, realizada por carbamidometil e **modificação variável**, por desoxidação, metilação, oxidação e transformação do triptofano em cinurenina; **valores de massa**, monoisotópicos; **massa das proteínas**, sem restrição; **tolerância à massa dos peptídeos**,  $\pm 150$  ppm; **tolerância à massa dos fragmentos**,  $\pm 0,75$ Da e **máximo de locais não hidrolisados**, dois.

## 2.8 Processamento adicional dos dados

As proteínas identificadas foram subsequentemente analisadas utilizando-se várias ferramentas de bioinformática. A informação de base foi obtida pelos bancos de dados InterProt, UniProt e NCBI. A classificação em superfamília foi realizada com base na identificação dos domínios conservados das proteínas de acordo com a base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). O ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (MW) teórico foram determinados utilizando-se o *software ExPASy Molecular Biology Server* (<http://web.expasy.org/protparam/>) (WALKER et al., 2005). A anotação funcional das proteínas identificadas foi realizada com base na *Gene Ontology Annotation* (GO; <http://www.geneontology.org>), utilizando os *softwares Blast2GO* versão 2.7.2 (<http://www.blast2go.de/>) (CONESA; GÖTZ, 2008) e o *Mercator Automated Sequence Annotation Pipeline* (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/app/mercator>) (LOHSE et al., 2014).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Otimização do protocolo de purificação dos extratos de proteínas totais para análise em gel 2-DE

O presente estudo sugere uma metodologia para a extração de proteínas totais de folhas de café para análise por gel 2-DE. Os parâmetros aqui apresentados poderão auxiliar na análise proteômica de outros tecidos desta espécie ou de folhas de outras espécies lenhosas. Este foi o primeiro estudo realizado com o objetivo de caracterizar as proteínas totais das folhas de *C. arabica* cv. Mundo Novo.

Foram testados diferentes protocolos de ressuspensão e purificação de extratos proteicos das folhas de café. No 1º protocolo, que utilizou o tampão I para ressuspender o pellet, seguido de purificação da amostra por coluna *PD SpinTrap™ G-25*, foram obtidos cerca de  $4,8 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de proteína, valor considerado alto. No entanto, após a separação por 2-DE (60  $\mu\text{g}$  de proteína, *IPG DryStrips 7cm* e pH 3-10 NL), os géis apresentaram baixa qualidade com arrastes verticais e horizontais e fraca resolução dos *spots*, impossibilitando a sua análise pelo *software* (Fig. 2A). Estes resultados sugerem a presença de impurezas na amostra, o que interferiu negativamente na focalização e na solubilidade das proteínas ao longo da corrida (GÖRG, 2004). Foi igualmente observado que a maior parte dos *spots* encontrava-se na região mais ácida/neutra do gel. Assim, foram introduzidas três modificações ao protocolo inicial: a composição do tampão de ressuspensão do *pellet* (tampão II com SDS), o método de purificação utilizado (*2D Clean Up* kit e/ou coluna PD10) e o gradiente de pH das *IPG DryStrips* (pH 4-7).

Os perfis dos géis 2-DE (*IPG DryStrips 13 cm* e pH 4-7 L) obtidos a partir das proteínas purificadas pelo 2º (tampão II + *2D Clean Up* kit) e 3º

protocolos (tampão I+ coluna PD10 + kit *2D Clean Up*) testados foram bastante semelhantes entre si, apresentando melhorias significativas em relação ao 1º protocolo, não só na resolução dos *spots*, mas, principalmente, quanto à pureza das amostras (Fig. 2B e 2C). No entanto, o rendimento em conteúdo proteico foi inferior ao obtido anteriormente (1º protocolo). No 2º protocolo foram obtidos cerca de  $0,87 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de proteína e, no 3º protocolo, cerca de  $0,98 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

A melhora da qualidade no resultado da eletroforese 2-DE através da remoção de contaminantes interferentes, além da qualidade da separação das proteínas, foi fator determinante para a escolha do 2º protocolo, comparado ao 1º protocolo. Este protocolo apresentou *spots* mais redondos e definidos (melhor focalização), além de menor custo, comparado com o 3º protocolo. Nesta etapa do trabalho não foi realizada uma análise utilizando o *software* para verificar a quantidade de *spots* presente no 2º e 3º protocolos testados, uma vez que o objetivo era a obtenção de géis com a melhor resolução possível e com o método de extração mais simples.

### 3.2 Análise global das proteínas totais por 2-DE

Com o objetivo de caracterizar o proteoma das folhas de cafeeiro, foi realizada a extração das proteínas totais por precipitação em TCA/acetona, seguida de purificação com o kit *2D Clean Up* e separação por 2-DE (300  $\mu\text{g}$  de proteína em *IPG Dry Strips* de 18cm). A análise dos nove géis pelo *software Progenesis Same Spot* revelou um total de 346 spots em gradiente de pH de 4-7 e com a massa molecular que variou entre 5 e 150 kDa. Para a identificação das proteínas por *MALDI-TOF/TOF MS*, foram retirados dos géis os *spots* mais abundantes e bem definidos, tendo sido identificadas proteínas em 167 *spots*, 37 dos quais com mais do que uma identificação significativa (Fig. 2 e Tabela 1 - Anexo).

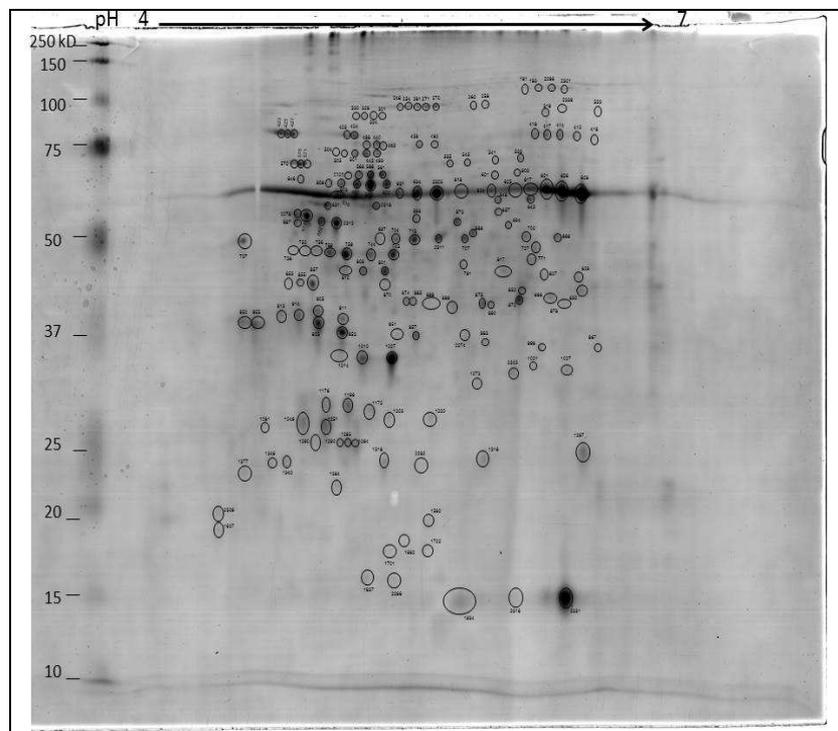


Figura 2 Gel 2DE corado com *Colloidal Coomassie Blue G-250*, representando as proteínas totais de folhas de cafeeiro. Os números indicados na imagem são dos *spots* de proteínas isolados a partir do gel e, subsequentemente, identificados por MALDI-TOF/TOF – MS (Tabela 1 - ANEXO)

As proteínas identificadas pertencem a 55 superfamílias, das quais as mais representadas são *ATP-synthase* (22 *spots*) e *ABC-ATPase* (15 *spots*) e a ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) subunidade maior e menor (19 *spots*). As enzimas ATP sintetases estão envolvidas no transporte e na ligação de proteínas, cátions e compostos com ferro. A RuBisCO é responsável pela primeira reação do ciclo de Calvin, catalisando a fixação do CO<sub>2</sub>. É uma enzima bifuncional que catalisa tanto a fixação do carbono fotossintético como, em determinadas circunstâncias, realiza a fixação de O<sub>2</sub> no processo de fotorrespiração (NCBI database). Ainda ligada à fotossíntese, mas envolvida nas

reações de luz, há a superfamília das proteínas com clorofila a/b (9 *spots*) e as superfamílias *Photosystem (PS)* com proteínas do fotossistema I e II (7 *spots*). A superfamília dos *Elongation factors* com 9 *spots* exerce uma diversidade de funções, como: (a) o transporte do complexo aminoacil-tRNA até o ribossomo durante a síntese proteica, (b) a atividade de chaperonas, degradando a sequência N-terminal das proteínas e (c) podem estar envolvidas na resistência à bactérias patogênicas (FU; MOMCILOVIC; PRASAD, 2012). As proteínas de choque térmico (HSPs) são consideradas uma das principais classes de moléculas chaperonas em plantas superiores e têm papel crucial para proteger as plantas contra estresses, restabelecendo a configuração normal da proteína e, assim, ajudando a manter a homeostasia celular (AGHDAM et al., 2013). No presente trabalho elas são representadas pela superfamília *Nucleotide-Binding Domain of the sugar kinase/HSP70/actin*, com 6 *spots* no total.

Foram detectados diferentes *spots* para a mesma proteína (mesmo número de acesso, UniProtKB), como, por exemplo, a proteína *isoflavone reductase* (*spots* 852; 875; 880; 889; 899) com um pI que variou entre 5,5-6,2 e uma MW 35 kDa; a RubisCO (*spots* 617; 624; 625; 626; 628; 697) com um pI que variou entre 5,8-6,4 e uma MW 53 kDa; as quitinases (*spots* 905; 911; 913; 914; 925; 951; 952; 953; 955) com um pI que variou entre 4,5-5,5 e uma MW 35 kDa ou a *RubisCO activase* (*spots* 672; 745; 752; 758; 759; 2278; 738) com um pI que variou entre 4,8-5,5 e uma MW 48 kDa. Nestes casos, a variação entre os *spots* da mesma proteína ocorre no nível do pI observado no gel e o seu valor teórico. Pressupõe-se que as variações observadas relativamente ao pI ocorram devido à presença de isoformas das proteínas variantes do mesmo produto gênico (CASTILLEJO et al., 2010) ou, eventualmente, à perda de solubilidade das proteínas durante a migração no gel 2-DE, tal como sugerido por Hajheidari et al. (2005). No entanto, também se considera a possibilidade de terem ocorrido modificações pós-traducionais (PTM), principalmente quando o valor MW

observado no gel não é igual ao valor teórico apresentado na Tabela 1, como é o caso das quitinases e *RuBisCO activase*, entre outras. Resultados semelhantes têm sido descritos em outros trabalhos, como o de Zadraznik et al. (2013), durante a análise do proteoma diferencialmente expresso em resposta ao estresse da seca em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), ao visualizar o aparecimento da Rubisco em vários pontos diferentes do gel.

Na anotação funcional das proteínas, realizada pelo *software* Blast2GO, algumas das classes foram agrupadas para facilitar a análise. Duas categorias representam 90% da função molecular, sendo elas: ligação (43%) e atividade catalítica (41%) (Fig. 3A). Considerando o processo biológico, a maioria das proteínas estava envolvida no processo metabólico (21%), no processo celular (19%), na resposta a estímulos (11%) e nos processos de organismos singulares (11%) (Fig. 3B). Quando analisado o componente celular, grande parte das proteínas totais extraídas está presente na célula (27%), nas organelas (25%) e na membrana (18%) (Fig. 3C).

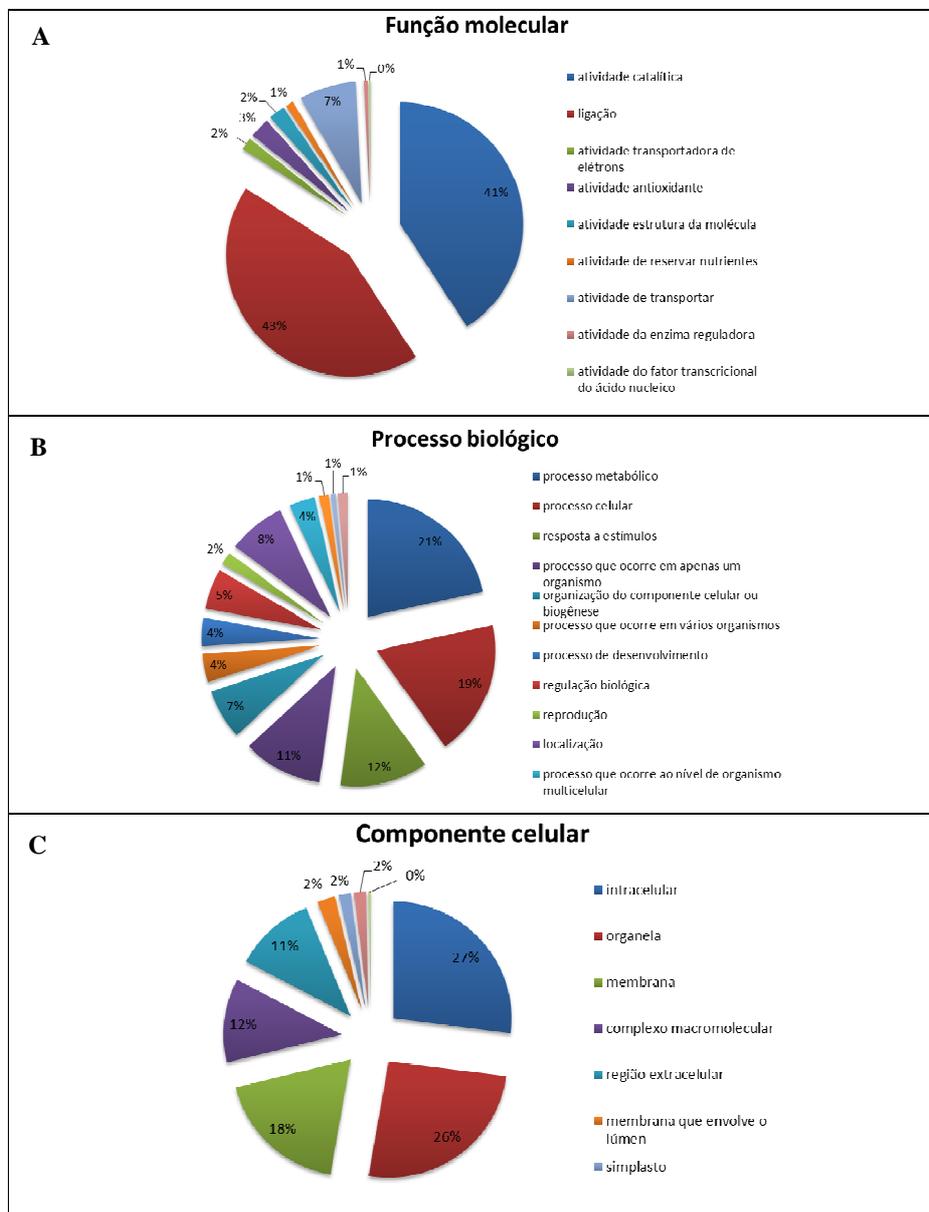


Figura 4 Anotação funcional da função molecular (A), processo biológico (B) e componente celular (C) de proteínas totais de folhas de cafeeiro, analisados pelo *software* Blast2GO

Por meio do *software* Mercator, verificou-se que as proteínas ligadas ao metabolismo fotossintético representaram 47% das proteínas identificadas no perfil do gel 2-DE das folhas do cafeeiro (Fig. 4). O metabolismo ligado às proteínas (síntese, degradação, alvo e ligação a cofatores) representa 14%, seguido do estresse (9%), enzimas com atividade oxidativa/redutora (6%) e glicólise (3%). Uma quantidade maior de proteínas relacionadas à fotossíntese, comparada a outras, era esperada, uma vez que a análise proteômica foi realizada a partir de proteínas totais de folhas do cafeeiro.

Resultados semelhantes foram observados no proteoma de folhas de *Medicago truncatula*, no qual aproximadamente 33% das proteínas identificadas podem ser atribuídas à fotossíntese (CASTILLEJO et al., 2010) e de *Clematis chinensis* (ISHTIAQ et al., 2014), o que corrobora os achados de Liu et al. (2014) na análise do proteoma de folhas de videira. Os autores observaram que, entre as proteínas identificadas, a maior parte era representada por proteínas relacionadas à fotossíntese, perfazendo um total de 20%. Li et al. (2011) e Mesquita et al. (2012) também observaram que a maior parte das proteínas identificadas em folhas de *Camellia sinensis* e soja, respectivamente, estava relacionada à fotossíntese.

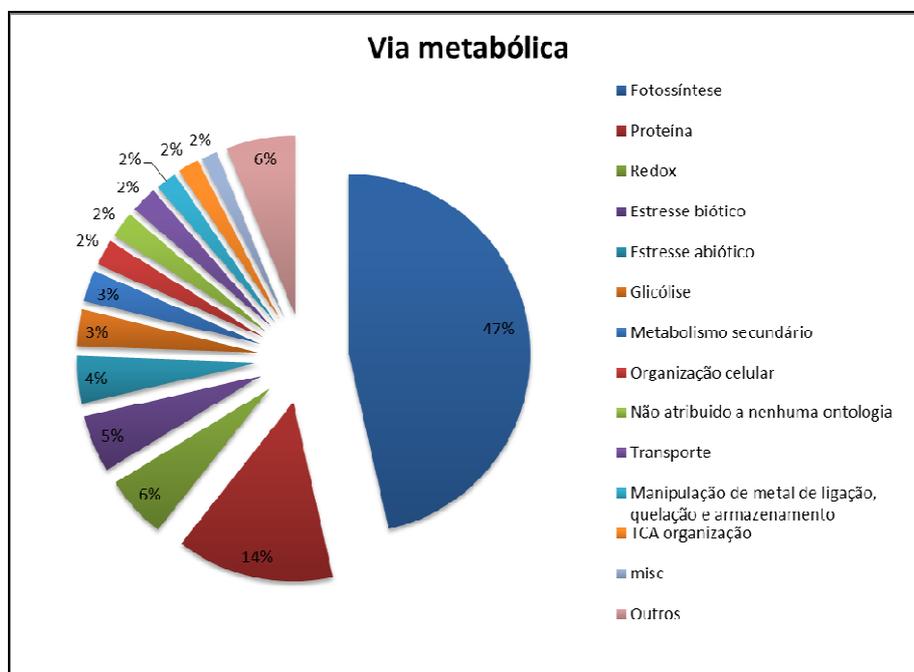


Figura 5 Processo metabólico de proteínas totais de folhas de cafeeiro, originado pelo *software* Mercator (com base na classificação do MAPMAN)

Dentre as proteínas envolvidas no estresse, foram encontradas proteínas relacionadas com a patogenicidade, proteínas PR: quitinasases (*spots* 905; 911; 913; 914; 925; 951; 952; 953; 955), *germin-like* (*spots* 727; 771; 1021) e proteínas MLP, que têm homologia com as PR-10 (*spots* 1560, 1701).

Fazendo parte da constituição de um grupo de proteínas antifúngicas, as quitinasases catalisam a hidrólise da ligação  $\beta$ -1,4 glicosídica da quitina, um importante componente da parede celular de fungos que, ao ser degradada, vai inibir o seu crescimento. Elas diferem em sete classes que são agrupadas a 4 famílias de PRPs: PR-3 (classes I, II, IV, V, VI e VII), PR-4 (classes I, II), PR-8 (classe III) e PR-11 (classe I) (VAN LOON et al., 2006). Neste estudo, as quitinasases encontradas constitutivamente presentes em proteínas totais de folhas do cafeeiro pertencem à

classe III, ou seja, são consideradas PR-8. Esta classe de quitinase também foi identificada em grãos de café (MANAVSKI et al., 2012).

As proteínas *miraculin-like* (MLPs) têm atividade antifúngica, inibidora de protease, E função de defesa da planta (TSUKUDA et al., 2006). Tendo homologia com as PR-10, para além da função direta na defesa, estas proteínas são implicadas na função geral durante o estresse, bem como durante as mudanças fisiológicas em certas fases do desenvolvimento da planta (FERNANDES et al., 2013). No entanto, alguns membros desta família também expressam constitutivamente, indicando um papel biológico mais geral no desenvolvimento da planta (SINHA et al., 2014).

Algumas das proteínas de estresse/defesa encontradas no presente estudo, como as proteínas PR e oxidases, já haviam sido descritas como constitutivamente presentes no apoplasto de *C. arabica* (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2014), nomeadamente as proteínas *germin-like*, endoquitinases, peroxidases e superóxido dismutases. As *germin-like* fazem parte de uma família de proteínas bastante heterogênea, podendo apresentar atividade oxidativa (oxalato oxidase ou superóxido dismutase). Estão presentes em vários órgãos e em vários estágios de desenvolvimento da planta, e em uma série de respostas a estresses bióticos e abióticos. O aumento da atividade de algumas destas enzimas, como as proteínas PR e oxidases, entre outras, em plantas de cafeeiro resistentes (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2012), sugere que estas proteínas possam ser candidatas a marcadores de resistência e, no futuro, poderão ser utilizadas na seleção de novas cultivares com interesse agrônômico.

Além destas, foram encontradas proteínas com atividade oxidativa, tais como catalases (*spot* 621), superóxido dismutases (*spot* 1172), ascorbato peroxidases (*spots* 983, 1073) e catecol oxidases (*spots* 533; 541), as quais estão envolvidas em um dos primeiros mecanismos de resposta de defesa/estresse em plantas, ou seja, a explosão oxidativa ou o acúmulo de espécies reativas de

oxigênio (ROS). As ROS podem também funcionar como moléculas sinalizadoras e, assim, desencadear outros mecanismos de defesa nas plantas (DAT et al., 2000). No entanto, estas moléculas são altamente tóxicas para a célula, quando acumuladas em grande quantidade, podendo danificar os tecidos vegetais (RESENDE et al., 2003). Proteínas como a superóxido dismutase, a catalase e as peroxidases podem atuar ao nível da produção/degradação dos ROS, regulando o mecanismo de sinalização/defesa das plantas (MITTLER et al., 2004; RESENDE et al., 2003).

#### **4 CONCLUSÃO**

Foi definida uma metodologia para a caracterização do proteoma de folhas sadias de cafeeiro.

Identificaram-se diversas proteínas envolvidas na fotossíntese e também algumas relacionadas com o estresse biótico e abiótico, que poderão auxiliar a melhor compreender as respostas de defesa do cafeeiro.

## ANEXO

Tabela 3 Anotação funcional das proteínas totais solúveis detectadas em folhas de caféiro

Superfamília das proteínas <sup>a</sup>	Número do Spot <sup>b</sup>	Identificação das proteínas [espécie] <sup>c</sup>	Número de acesso <sup>d</sup> (GI acc.no.)	Valores teóricos	
				pI <sup>e</sup>	MW (kDa) <sup>e</sup>
	808	Ribulose-bisphosphate carboxylase activase (fragment) [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	100380	5,01	25,9294
	570; 682; 687; 744	Rubisco activase, partial [ <i>Zantedeschia aethiopica</i> ]	13430334	6,69	37,0495
	756	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase, partial [ <i>Oryza sativa Indica</i> Group]	13569643	4,78	21,6944
<i>ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domain superfamily</i>	672; 738; 745; 752; 758; 759; 2278	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, partial [ <i>Pachysandra terminalis</i> ]	94549022	5,55	34,5482
	810	PREDICTED: ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225449432	5,5	48,0147
	666	Eukaryotic translation initiation factor 4A1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	590574156	5,47	46,8325
<i>Aconitase catalytic domain superfamily</i>	181; 183; 2321	PREDICTED: aconitate hydratase 2, mitochondrial [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225460961	6,66	110,0564
<i>Aldo-keto reductases (AKRs) superfamily</i>	878	PREDICTED: probable aldo-keto reductase 2-like [ <i>Citrus sinensis</i> ]	568868403	6,34	37,7271
<i>Alkaline phosphatase homologues superfamily</i>	555	Phosphoglycerate mutase family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	224140653	5,4	61,1814
<i>Alpha amylase catalytic domain superfamily</i>	260	PREDICTED: galactinol--sucrose galactosyltransferase [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225452378	5,54	85,2481
<i>Aspartate aminotransferase (AAT) superfamily</i>	673	Glutamate 1-semialdehyde aminotransferase [ <i>Polytomella sp. Pringsheim</i> ]	25808964	8,54	50,7945
	666	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	114557	5,15	53,4703
	501; 606	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	7525018	5,19	55,3282
<i>ATP_synthase superfamily</i>	631; 634	ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [ <i>Coffea arabica</i> ]	7708197	5,21	52,7766
	603	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast) [ <i>Calycanthus floridus</i> var. <i>glaucus</i> ]	32480828	5,2	55,1871
	2319	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic [ <i>Populus euphratica</i> ]	115502358	9,97	10,6213

Tabela 3, continuação...

Superfamília das proteínas <sup>a</sup>	Número do Spot <sup>b</sup>	Identificação das proteínas [espécie] <sup>c</sup>	Número de acesso <sup>d</sup> (GI acc.no.)	Valores teóricos	
	1837	ATP synthase CF1 epsilon subunit (chloroplast) [ <i>Coffea arabica</i> ]	116617114	5,83	14,3626
	270; 618; 2303	ATP synthase CF1 beta subunit (chloroplast) [ <i>Coffea arabica</i> ]	116617115	5,36	53,6665
	608	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast) [ <i>Gossypium thurberi</i> ]	325210915	5,32	55,6024
	609	ATP synthase CF1 alpha subunit, partial [ <i>Chamaedorea seifrizii</i> ]	338825688	5,41	55,4634
	596	ATP synthase CF1 alpha subunit, partial [ <i>Potamogeton pectinatus</i> ]	338825738	5,27	55,5004
	639	PREDICTED: ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like [ <i>Brachypodium distachyon</i> ]	357135971	5,95	58,9241
	602; 607	ATP synthase alpha chain (chloroplast) [ <i>Aloe vera</i> ]	372479636	5,42	55,3343
	2325	ATP synthase CF1 alpha subunit, partial [ <i>Coffea boinensis</i> ]	385267533	5,13	36,0442
	324; 330	ATP synthase CF1 alpha subunit, partial [ <i>Coffea ratsimamangae</i> ]	385267615	5,06	36,114
	866	PREDICTED: ATP synthase gamma chain, chloroplastic-like [ <i>Cucumis sativus</i> ]	449433954	8,46	40,814
	588	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast) [ <i>Cocos nucifera</i> ]	528748761	5,7	56,1221
	442	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase A subunit [ <i>Citrus unshiu</i> ]	6721571	6,16	35,6015
ATPase superfamily	736	Vacuolar-type H <sup>+</sup> -ATPase subunit A [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	62318769	5,61	9,4707
	603; 606	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit B 1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225428086	5,04	54,2867
Catalase superfamily	621	Catalase 3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2347178	8,31	56,6964
	571	Chaperonin-60 alpha subunit [ <i>Avicennia marina</i> ]	10697184	6,34	35,2147
	588	PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225435794	5,8	64,608
Chaperonin_like superfamily	1203	PREDICTED: 20 kDa chaperonin, chloroplastic [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225444649	8,96	26,3964
	1220	groes chaperonin, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	255550363	8,89	26,5983
	2325	PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic-like [ <i>Glycine max</i> ]	356525839	5,85	62,8409

Tabela 3, continuação...

Superfamília das proteínas <sup>a</sup>	Número do Spot <sup>b</sup>	Identificação das proteínas [espécie] <sup>c</sup>	Número de acesso <sup>d</sup> (GI acc.no.)	Valores teóricos		
Chlorophyll A-B binding protein superfamily	581	PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic-like [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	460366131	5,72	62,9921	
	576	PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic-like isoform X1 [ <i>Glycine max</i> ]	571489137	5,23	61,7055	
	1176; 1251	Chlorophyll a/b binding protein, partial [ <i>Brassica napus</i> ]	86169487	4,72	8,1781	
	1249	Chlorophyll A/B binding protein [ <i>Gardenia jasminoides</i> ]	224381552	5,28	28,1821	
	1281	PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225461315	5,24	28,824	
	1285; 1290; 1292	Type III chlorophyll a/b binding protein [ <i>Gardenia jasminoides</i> ]	293337343	6,32	29,6748	
	1294	Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	407970998	5,33	28,7747	
	1318	Chlorophyll a-b binding protein 1B-21, chloroplastic [ <i>Triticum urartu</i> ]	473736509	4,93	21,7469	
	Clp superfamily	261	ClpC protease (chloroplast) [ <i>Spinacia oleracea</i> ]	4105131	8,78	99,4794
		271	ATP-dependent clp protease [ <i>Cucumis melo subsp. melo</i> ]	307136002	6,78	103,3096
248		Clp ATPase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	334185828	5,91	102,2422	
Cupin superfamily	1021	Germin-like protein 10 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	42572763	9,43	20,3234	
	727; 771	Germin-like protein, partial [ <i>Genlisea aurea</i> ]	527204558	5,41	21,4687	
Cupredoxin superfamily	1627	PREDICTED: plastocyanin, chloroplastic isoform 1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225459768	5,29	17,0055	
Cytochrome B6-F complex superfamily	1384	Photosynthetic electron transfer C [ <i>Theobroma cacao</i> ]	590690175	8,15	24,2899	
	321; 324; 328; 330	elongation factor G [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	62320893	5,33	44,9453	
EFG (elongation factor G) superfamily	2294	Elongation factor 2 family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	224094244	5,96	93,9532	
	673	Elongation factor tu, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	255540493	5,98	50,1223	
	181	PREDICTED: elongation factor 2-like [ <i>Cucumis sativus</i> ]	449456130	5,85	88,6432	

Tabela 3, continuação...

Superfamília das proteínas <sup>a</sup>	Número do Spot <sup>b</sup>	Identificação das proteínas [espécie] <sup>c</sup>	Número de acesso <sup>d</sup> (GI acc.no.)	Valores teóricos	
	2296	PREDICTED: elongation factor 2-like isoform 1 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	460399098	5,84	94,1193
	183	PREDICTED: elongation factor 2-like [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	460399105	5,84	94,13333
<i>Esterase_lipase superfamily</i>	913	PREDICTED: carboxylesterase 1-like [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	565382793	4,87	36,7329
	957	Esterase d, s-formylglutathione hydrolase [ <i>Theobroma cacao</i> ];	590635528	6,25	31,9572
<i>Ferritin superfamily</i>	1166; 1172; 1176	Ferritin [ <i>Coffea arabica</i> ]	290020584	5,72	32,1532
<i>FIG (FBPase/IMPase/glpX)-like superfamily</i>	853; 855; 857	Sedoheptulose-bisphosphatase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	590562472	6,55	42,3193
<i>FtsH Extracellular superfamily</i>	501; 493	Cell division protein ftsH, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	255558698	6,43	75,3801
	498; 504	FtsH extracellular protease family isoform 2, partial [ <i>Theobroma cacao</i> ]	508708033	9,15	49,6248
<i>GH_18_chitinase-like superfamily</i>	905; 911; 913; 914; 925; 951; 952; 953; 955	Class III chitinase precursor, partial [ <i>Coffea arabica</i> ]	296399179	5,1	29,0086
<i>GH_38 superfamily</i>	418	PREDICTED: lysosomal alpha-mannosidase-like [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	565399766	6,43	116,4061
<i>Gln-synt (glutamine synthase)superfamily</i>	707; 2311	Plastid glutamine synthetase 2 [ <i>Spinacia oleracea</i> ]	154017627	6,04	47,3816
<i>Gp-dh (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase) superfamily</i>	699	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [ <i>Capsicum annuum</i> ]	18072799	6,34	33,8618
	700	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic-like [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	460385509	6,86	50,94
<i>Haloacid dehalogenase-like hydrolases superfamily</i>	957	PREDICTED: phosphoglycolate phosphatase 1B, chloroplastic-like [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	565373406	7,48	39,5943
<i>Late embryogenesis abundant protein superfamily</i>	913	Late embryogenesis abundant protein, group 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	590627543	4,69	34,5283
<i>MDR (Medium chain reductase/dehydrogenase superfamily)</i>	791; 817	PREDICTED: quinone oxidoreductase-like protein At1g23740, chloroplastic-like [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	460385950	7,74	41,0011
<i>MSP (manganese-stabilising protein)superfamily</i>	1007; 1010	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic [ <i>Genlisea aurea</i> ]	527190719	6,48	34,6532
<i>NADH-G superfamily</i>	319	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 1, mitochondrial [ <i>Prunus mume</i> ]	645246428	5,72	66,1855

Tabela 3, continuação...

Superfamília das proteínas <sup>a</sup>	Número do Spot <sup>b</sup>	Identificação das proteínas [espécie] <sup>c</sup>	Número de acesso <sup>d</sup> (GI acc.no.)	Valores teóricos	
<i>Não atribuído</i>	737	Nodulin-related protein 1, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	590699457	5,91	16,1668
	404	Hsp70, partial [ <i>Petunia x hybrida</i> ]	20559	5,06	70,782
	443	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial [ <i>Pisum sativum</i> ]	585272	5,81	72,3008
	405	HSP70 [ <i>Triticum aestivum</i> ]	2827002	5,13	71,0305
<i>Nucleotide-Binding Domain_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily</i>	423; 425	Heat shock protein 70 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	6746592	5,13	77,1056
	713	Actin, partial [ <i>Lotus japonicus</i> ]	158997742	5,14	29,3814
	704	Actin 2, partial [ <i>Carica papaya</i> ]	425872892	5,34	23,8574
	427	PREDICTED: stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like [ <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> ]	470142981	5,07	74,9446
<i>Nucleotide kinase superfamily</i>	808; 810	Phosphoribulokinase family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	224071429	5,9	44,9781
	801	Phosphoribulokinase, partial [ <i>Genlisea aurea</i> ]	527194042	5,5	41,9997
<i>PAP_fibrillin superfamily</i>	1166	Fibrillin 4 [ <i>Coffea canephora</i> ]	88175351	9,05	31,7983
<i>Peptidase_M16 superfamily</i>	601	PREDICTED: probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225452974	6,42	58,4815
	600	Mitochondrial processing peptidase [ <i>Genlisea aurea</i> ]	527200206	6,3	59,011
<i>Peptidase_M41 superfamily</i>	505	PREDICTED: ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 2, chloroplastic-like [ <i>Citrus sinensis</i> ]	568829330	4,62	12,4732
<i>Phosphoglycerate_kinase superfamily</i>	684; 688	Phosphoglycerate kinase (chloroplast) [ <i>Nicotiana benthamiana</i> ]	313585890	7,66	50,0838
	983; 1073	Ascorbate peroxidase [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	559005	5,43	27,3881
<i>Plant_peroxidase_like superfamily</i>	1021; 2274	PREDICTED: thylakoid lumenal 29 kDa protein, chloroplastic-like isoform X2 [ <i>Citrus sinensis</i> ]	568837079	7,67	29,8927
<i>Porin3 superfamily</i>	999	Voltage-dependent anion channel protein [ <i>Spinacia oleracea</i> ]	1256259	6,59	29,6283
<i>Polyphenol oxidase middle domain_DWL superfamily</i>	533; 541	Chain A, Catechol Oxidase From Ipomoea Batatas ( <i>Sweet Potatoes</i> ) In The Native Cu(Ii)-Cu(Ii) State	6137614	5,56	38,7747

Tabela 3, continuação...

Superfamília das proteínas <sup>a</sup>	Número do Spot <sup>b</sup>	Identificação das proteínas [espécie] <sup>c</sup>	Número de acesso <sup>d</sup> (GI acc.no.)	Valores teóricos	
<i>PS bp superfamily</i>	1297; 1316	Oxygen-evolving enhancer protein 2 [ <i>Morus notabilis</i> ]	587863955	8,29	28,3336
<i>PS_aD superfamily</i>	1362; 1377	PREDICTED: photosystem I reaction center subunit II, chloroplastic isoform 1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225432620	9,74	22,4808
	870	Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplast precursor, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	255559812	7,11	43,4415
<i>Photosynthesis system_II_BNR superfamily</i>	885	PREDICTED: photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic-like [ <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> ]	470123459	6,55	44,1488
	874	PREDICTED: photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic-like [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	565376990	6,55	43,8466
<i>Ribosomal_L7_LI2 superfamily</i>	1377	Ribosomal protein L12-1a [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	20020	6,34	20,3213
<i>Ribosomal_S1_like superfamily</i>	738	PREDICTED: 30S ribosomal protein S1, chloroplastic-like [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	460366318	5,3	45,2646
<i>Ribosomal_S5_like superfamily</i>	987	PREDICTED: 30S ribosomal protein S5, chloroplastic-like [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	565360531	5,3	45,2646
	639; 2312	RbcL, partial (chloroplast) [ <i>Triticum aestivum</i> ]	12344	6,6	47,0026
	657	Ribulose biphosphate carboxylase large chain [ <i>Adoxa moschatellina</i> ]	131899	6,13	51,7362
	618	Ribulose biphosphate carboxylase large chain, partial (chloroplast) [ <i>Jasminum simplicifolium subsp. suavisimum</i> ]	131983	6,6	51,814
	617; 624; 625; 626; 628; 697	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [ <i>Coffea arabica</i> ]	116617116	6,13	53,3536
<i>RuBisCO_large superfamily</i>	545	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [ <i>Eustegia minuta</i> ]	125857561	5,87	50,3551
	687	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [ <i>Turillia lutea</i> ]	188529315	8,16	35,5215
	621	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [ <i>Logania sp. SH-2010</i> ]	306481525	6,21	49,5251
	2296	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [ <i>Scutellaria baicalensis</i> ]	344051307	8,13	33,9558
	987	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [ <i>Ocimum tenuiflorum</i> ]	408474837	6	23,9412

Tabela 3, continuação...

Superfamília das proteínas <sup>a</sup>	Número do Spot <sup>b</sup>	Identificação das proteínas [espécie] <sup>c</sup>	Número de acesso <sup>d</sup> (GI acc.no.)	Valores teóricos	
<i>RuBisCO_small</i> superfamily	1934; 2339	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit [ <i>Coffea arabica</i> ]	24940138	8,49	20,3915
	2316; 2331	Plastid ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit [ <i>Coffea arabica</i> ]	83375904	5,88	13,8449
<i>S-adenosylmethionine synthetase</i> superfamily	657	S-adenosylmethionine synthase, partial [ <i>Genlisea aurea</i> ]	527203281	5,64	42,7274
	700	Nucleoside-diphosphate-sugar dehydratase, partial [ <i>Plantago major</i> ]	106879583	5,07	22,6676
	852; 875; 880; 889; 899	Isoflavone reductase-like protein [ <i>Coffea arabica</i> ]	255529745	5,53	34,3763
	523	Unnamed protein product [ <i>Vitis vinifera</i> ]	297746027	5,92	37,1958
<i>SDR (Short-chain dehydrogenases/reductases)</i> superfamily	872	Phenylcoumaran benzylic ether reductase [ <i>Eucalyptus globulus</i> subsp. <i>globulus</i> ]	383081915	5,53	33,8259
	999; 1021	Putative NAD-dependent dehydrogenase 2 [ <i>Erythroxylum coca</i> ]	392056685	5,64	27,3301
	827	PREDICTED: malate dehydrogenase, mitochondrial-like [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	565386264	8,9	35,6671
	828	mRNA-binding family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	224066507	7,64	43,683
	1172	Protein Fe superoxide dismutase 1 [ <i>Morus notabilis</i> ]	587934143	5,41	35,0925
<i>SRPBCC</i> superfamily	1560; 1701	PREDICTED: MLP-like protein 28 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225424270	5,35	17,0801
	2286	Thioredoxin [ <i>Limonium bicolor</i> ]	154721452	9,63	20,2775
<i>Thioredoxin_like</i> superfamily	1662	Thioredoxin H-type 1, partial [ <i>Nicotiana benthamiana</i> ]	257222628	5,56	13,2973
	1340; 1346	Peroxiredoxin 2 [ <i>Tamarix hispida</i> ]	376341960	6,9	29,8009
	646	PREDICTED: protein disulfide-isomerase-like [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	460392863	4,98	55,5088
	1377	PREDICTED: 2-Cys peroxiredoxin BAS1-like, chloroplastic-like [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	460407951	6	29,4614
	2274	Triose-phosphate isomerase, cytosolic [ <i>Petunia x hybrida</i> ]	1351279	5,54	27,132
<i>TIM_phosphate_binding</i> superfamily	850	PREDICTED: probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic [ <i>Vitis vinifera</i> ]	225427768	8,13	42,9482

Tabela 3, conclusão...

Superfamília das proteínas <sup>a</sup>	Número do Spot <sup>b</sup>	Identificação das proteínas [espécie] <sup>c</sup>	Número de acesso <sup>d</sup> (GI acc.no.)	Valores teóricos	
	645	Enolase, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	255575355	5,62	47,9364
	1027; 2323	Triose phosphate isomerase cytosolic isoform-like protein [ <i>Capsicum annuum</i> ]	390098824	5,72	27,094
	828; 852	Fructose-bisphosphate aldolase 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	590702963	8,14	42,9239
	874	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic-like isoform X1 [ <i>Prunus mume</i> ]	645273256	8,21	42,7627
TPP (thiamine pyrophosphate)-enzymes superfamily	418	Chloroplast transketolase precursor, partial [ <i>Gossypium barbadense</i> ]	151368158	5,68	18,4287
	412; 416; 417	Transketolase family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	224063766	5,97	80,7162
	414	Transketolase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	508704351	6,34	80,6573
Tubulin_FtsZ superfamily	2319	Alpha-tubulin 2 [ <i>Populus tremuloides</i> ]	146149535	4,97	49,8274
	651	Beta-tubulin [ <i>Eucalyptus grandis</i> ]	153799899	4,74	50,4588

<sup>a</sup> Superfamília, de acordo com a classificação do NCBI, com base nos domínios conservados das proteínas.  
<sup>b</sup> Número que identifica os spots proteicos no gel 2-DE (Fig. 2)  
<sup>c</sup> Identificação dos peptídeos com base na homologia obtida com proteínas caracterizadas em *Coffea* sp. e em outras espécies por pesquisa através de BLASTp em bases de dados *ESTCoffee*  
<sup>d</sup> Número de acesso do GenBank, atribuído após análise por espectrometria de massa (MS/MS)  
<sup>e</sup> Valores de massa molecular (MW) e ponto isoelétrico (pI) determinados pelo *ExPASy Molecular Biology*, a partir do número de acesso da proteína (GI acc. no.)

## REFERÊNCIAS

AFROZ, A. et al. Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, p. 745-763, 2011.

AGHDAM, M. S. et al. Heat shock proteins as biochemical markers for postharvest chilling stress in fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 160, p. 54-64, 2013.

BANDIL, G. B. et al. Comparative proteomic analysis between early developmental stages of the *Coffea arabica* fruits. **Genetic Molecular Reserarch**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 5102-5110, 2013.

CARPENTIER, S. C. et al. Proteome analysis of non-model plants: A challenging but powerful approach. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 27, p. 354-377, 2008.

CASTILLEJO, M. A. et al. Two-dimensional gel electrophoresis-based proteomic analysis of the *Medicago truncatula*-rust (*Uromyces striatus*) interaction. **Annals of Applied Biology**, London, v. 157, p. 243-257, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: quarto levantamento**. Brasília, 2014. 51 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_12\\_22\\_09\\_53\\_55\\_boletim\\_dezembro\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_12_22_09_53_55_boletim_dezembro_2014.pdf)>. Acesso em: 11 jan. 2015.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 1, p. 1-13, 2008.

COSTA, T. S. **Análise do perfil transcriptômico e proteômico de raízes de diferentes clones de *Coffea canephora* em condições de déficit hídrico**. 2014. 238 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

DAMERVAL, C. et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 7, p. 52-54, 1986.

DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, p. 779–795, 2000.

FERNANDES, H. et al. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 280, p. 1169–1199, 2013.

FORERO, C. P. B.; MONCADA, M. P. Proteomic analysis of Colletotrichum kahawae-resistant and susceptible coffee fruit pericarps. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 138, p. 307–321, 2014.

FRANCO, O. L. et al. Proteomic evaluation of coffee zygotic embryos in two diferente stages of seed development. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 47, p. 1046–1050, 2009.

FU, J.; MOMCILOVIC, I.; PRASAD, P. V. V. Roles of protein synthesis elongation factor EF-Tu in heattolerance in plants. **Journal of Botany**, London, p. 1–8, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jb/2012/835836/ref/>>. Acesso em: 22 jun. 2014.

GIL-AGUSTI, M. T. et al. Two-dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 710–718, Feb. 2005.

GÖRG, A. **2-D electrophoresis: principles and methods**. Uppsala: GE Healthcare, 2004.

GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Effect of greenhouse conditions on the leaf apoplastic proteome of *Coffea arabica* plants. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 104, p. 128–139, 2014.

GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Integrated cytologic and proteomic analysis of *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 24., 2012. San Jose. **Proceedings...** San Jose: ASIC, 2012. p. 11–16.

HAJHEIDARI, M. et al. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 950–960, 2005.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. In: <<http://dev.ico.org/prices/m1.htm>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

ISHTIAQ, M. et al. Leaf Proteome Analysis of *Clematis chinensis*: A Traditional Chinese Medicine (TCM) by Two-Dimensional electrophoresis technique. **Pakistan Journal of Botany**, Carachi, v. 46, n. 3, p. 789-801, 2014.

JELLOULI, N. et al. Evaluation of Protein Extraction Methods for *Vitis vinifera* Leaf and Root Proteome Analysis by Two-Dimensional Electrophoresis. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 52, n. 10, p. 933–940, 2010

JORRIN, J. V.; et al. Proteomics: a promising approach to study biotic interaction in legumes. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, p. 37-47, 2006.

KOSHINO, L. L. et al. Comparative Proteomical Analysis of Zygotic Embryo and Endosperm from *Coffea arabica* Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 10922–10926, 2008.

LI, Q. et al. Proteomic analysis of young leaves at three developmental stages in an albino tea cultivar. **Proteome Science**, London, v. 9, p. 44, 2011.

LIU, G. T. et al. Differential proteomic analysis of grapevine leaves by iTRAQ reveals responses to heat stress and subsequent recovery. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 14, p. 110, 2014.

LIVRAMENTO, K. G. **Proteômica comparativa da interação genótipo, ambiente e processamento de grãos de café arábica**. 2014. 97 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LOHSE, M. et al. Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. **Plant Cell Environmental**, Oxford, v. 37, p. 1250-1258, 2014.

LÓPEZ, H. G. M. et al. **Evaluation of the Extracellular Proteome Profile During the Somatic Embryogenesis Process of *Coffea spp.*** Journal of the Mexican Chemical Society, v. 56, n. 1, p. 72-79, 2012.

MANAVSKI, N. et al. Cof a 1: identification, expression and immunoreactivity of the first coffee allergen. **International Archives of Allergy Immunology**, Basel, v. 159, p. 235–242, 2012.

MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 11, p. 4191–4212, 2012.

MEHTA, A. et al. Plant-pathogen interactions: what is proteomic telling us. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 275, p. 3731-3746, 2008.

MENDONÇA, L. M. C. **Análise do perfil transcriptômico e proteômico de raízes de diferentes clones de *Coffea canephora* em condições de déficit hídrico**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MESQUITA, R. O. et al. Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: Improvements in identification of new and low-abundance proteins. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 1, p. 353-361, 2012. Suppl.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 490–498, 2004.

MONTAVON, P.; MAURON, A. F.; DURUZ, E. Changes in green coffee protein profiles during roasting. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 2335-2343, 2003.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 9, p. 255–262, 1988.

RAMAGLI, L. S. Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 112, p. 99-103, 1999.

RAMOS, H. J. O. et al. Análise proteômica do estresse hídrico em cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: Embrapa Café, 2007. 1CD ROM.

RESENDE, M. L. V. et al. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

SINHA, M. et al. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. **The Scientific World Journal**, New York, v. 1, p. 19, 2014.

TONIETTO, A. et al. Proteomic analysis of developing somatic Embryos of *Coffea arabica*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 30, p. 1393–1399, 2012.

TSUKUDA, S. et al. Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. **Plant Molecular Biology Report**, Athens, v. 60, p. 125-136, 2006.

VAN LOON, L. C. et al. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

WALKER, J. et al. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. Totowa: Humana, 2005.

WANG, W.; TAI, F.; CHEN, S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 31, p. 2032-2039, 2008.

ZADRAZNIK, T. et al. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 78, p. 254-271, 2013.

### CAPÍTULO 3

#### ANÁLISE DA ALTERAÇÃO NA ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS DE FOLHAS DE *C. arabica* cv. Mundo Novo, APÓS O TRATAMENTO COM INDUTORES DE RESISTÊNCIA E INFECÇÃO POR *H. vastatrix*

#### RESUMO

A ferrugem-alaranjada (*Hemileia vastatrix* Berk & Br) é uma das principais doenças do cafeeiro arábica (*Coffea arabica* L.). O principal método de controle desta doença é a aplicação de fungicidas, que têm impacto negativo no ambiente e na saúde humana. A pesquisa de métodos alternativos de controle desta doença, nomeadamente por meio de produtos/compostos indutores de resistência das plantas, poderá ser uma importante ferramenta para o manejo fitossanitário sustentável das lavouras. O trabalho foi realizado com o objetivo de comparar as proteínas com diferença na abundância relativa em folhas de cafeeiro tratadas com os indutores de resistência, GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup>, e infectadas com o fungo *H. vastatrix*. As proteínas totais solúveis foram extraídas das folhas de cafeeiro e separadas por 2-DE. Os *spots* polipeptídeos com diferença na abundância relativa foram excisados do gel e identificados por espectrometria de massa (MS). Foram identificadas 65 proteínas que estão envolvidas na fotossíntese, no estresse abiótico/biótico, no metabolismo ligado às proteínas, na glicólise e na atividade oxidativa/redutora. Após pulverização com GreenForce CuCa, verificou-se que as proteínas mais abundantes estão envolvidas na fotossíntese. Já no que se refere à pulverização com Bion<sup>®</sup>, as proteínas mais abundantes estão envolvidas no metabolismo energético e de estresse. O perfil proteico das folhas tratadas com Bion<sup>®</sup> mostrou-se mais semelhante ao da testemunha do que ao do GreenForce CuCa. A caracterização das proteínas diferencialmente expressas das plantas de cafeeiro tratadas com os indutores de resistência revelou um aumento na abundância de proteínas envolvidas no metabolismo energético (fotossíntese e respiração), sugerindo modificações ao nível do metabolismo primário das plantas.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *H. vastatrix*. Indutor de resistência. Proteoma de folhas. Espectrometria de massa.

**ALTERATION ANALYSIS IN PROTEIN ABUNDANCE OF THE  
LEAVES *C. arabica* cv. *MUNDO NOVO*, AFTER TREATMENT WITH  
INDUCERS RESISTANCE AND INFECTION BY *H. vastatrix***

**ABSTRACT**

The coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br) is a major disease of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.). Fungicides are the most common mean to control this disease; but with a negative impact on the environment and human health. The research of alternative methods to control this disease, including through product/compounds of plant resistance inducers, that can be an important tool for sustainable phytosanitary management of crops. This work had the objective to compare the proteins differing in the relative abundance of coffee leaves treated with resistance inducers (GreenForce CuCa and Bion<sup>®</sup>) and infected with the fungus *H. vastatrix*. The total soluble protein were extracted of coffee leaf and separated by 2-DE. The polypeptides spots differing in the relative abundance were removed from the gel and identified by mass spectrometry (MS). Sixty five proteins were identified involved in photosynthesis, in abiotic/biotic stress, protein metabolism, glycolysis and oxidative/reductive activity. After spraying with GreenForce Cuca, it was found that the most abundant proteins are involved in photosynthesis. In what regards the Bion<sup>®</sup> spraying, the most abundant proteins are involved in energy metabolism and stress. The protein profile of the leaves treated with Bion<sup>®</sup> was more similar to the control than to the GreenForce CuCa. The proteins characterization differentially expressed in coffee plants treated with resistance inducers revealed an increase in the abundance of proteins involved in energy metabolism (photosynthesis and respiration), suggesting changes at the primary metabolism level of the plants.

Keywords: *Coffea Arabica*. *H. vastatrix*. Resistance inducer. Leaf proteome.

Mass spectrometry.

## 1 INTRODUÇÃO

A ferrugem-alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br, é uma das principais doenças do cafeeiro arábica (*Coffea arabica* L.). Em condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, esta doença pode causar perdas de produção de até 50% (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005), sem controle químico (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). No entanto, os fungicidas são uma fonte de contaminação ambiental, podendo provocar danos à saúde e, a longo prazo, podem ocorrer raças resistentes do patógeno (ABRAHÃO et al., 2009; AMARAL et al., 2008). Para controlar este problema, diversos estudos têm sido realizados, visando desenvolver métodos alternativos de controle de doenças em plantas (RESENDE et al., 2002).

A compreensão dos mecanismos de defesa relacionados com a resistência do cafeeiro a patógenos é muito importante, para auxiliar o desenvolvimento de produtos/compostos capazes de induzir a expressão destes mecanismos para a proteção das plantas. Nesse contexto, a indução de resistência vem sendo uma importante ferramenta para o manejo fitossanitário sustentável e integrado das lavouras. A resistência sistêmica adquirida (SAR), ou indução de resistência (IR), ativa os mecanismos de defesa das plantas por meio de alterações estruturais (deposição de calose, lignina, papila, etc.) ou químicas (aumento de atividade de enzimas, acumulação de moléculas sinalizadoras, etc.), por meio de tratamento com agentes bióticos ou abióticos, aumentando, assim, a resistência geral da planta (CAVALCANTI et al., 2004; RESENDE et al., 2004).

Avanços nas pesquisas envolvendo a indução de resistência em plantas vêm sendo acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente. Resultados promissores foram alcançados com a utilização do indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM, produto do grupo benzotiadiazole ou

BTH) e Bion<sup>®</sup>, nome comercial. Guzzo et al. (2001) e Marchi, Borges e Resende (2002) relataram que a aplicação do produto proporcionou proteção contra *H. vastatrix* em mudas de cafeeiro das cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho M-99. Esse efeito indutor do ASM contra a ferrugem foi confirmado por NOJOSA (2003), em cujo trabalho o tratamento com ASM proporcionou 52% de controle em mudas de cafeeiros infectadas. Segundo Martins et al. (1998), este produto foi capaz, em condições controladas, de induzir proteção contra *H. vastatrix* por até 10 semanas. Este produto também foi eficiente no controle de ferrugem em plantas de cafeeiro cv. Mundo Novo, em lavouras de café em ano de baixa safra (FERNANDES et al., 2013). Nardi et al. (2006), utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real e da técnica de microarranjo, observaram que, após 16 horas de pulverização com ASM em cafeeiro, foi induzida a expressão de genes de defesa da resistência sistêmica adquirida, nomeadamente glutatona-S-transferase, superóxido dismutase, peroxidase, quitinase e lipoxigenase.

Alguns estudos têm confirmado o potencial de extratos vegetais na ativação da SAR. Extratos de plantas podem conter múltiplos eliciadores e, além disso, formulações obtidas de resíduos/ subprodutos da lavoura/indústria de café, que estão sob sigilo de patente (PI 0603575-2 e PI 0705598-6), apresentaram resultados promissores no controle de diversos patógenos do cafeeiro e em outros cultivos (AMARAL, 2005; BARGUIL et al., 2005; MEDEIROS et al., 2010; RESENDE et al., 2004). Dentre essas formulações, destaca-se a registrada como GreenForce CuCa, pela Agrofiness Tecnologia Agrícola Ltda., empresa da Incubadora de Empresas da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG.

A eficiência desses produtos no controle de fitopatógenos tem sido observada em vários patossistemas, em ensaios de laboratório, casa de vegetação e condições de campo (BONALDO et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2006; GUZZO; MARTINS; MORAES, 1987).

Outra formulação à base de 60% de subprodutos da cadeia produtiva do café acrescido de cobre e cálcio, denominada GreenForce CuCa, vem sendo testada e tem apresentado resultados promissores no controle de doenças. Em mudas de cafeeiro cv. Iapar 59, observou-se que o uso desta formulação reduziu 87,3% da severidade da cercosporiose em relação à testemunha, quando pulverizados com GreenForce CuCa 168 hai (ANDRADE et al., 2013). Martins et al. (2013) também obtiveram sucesso com o uso de GreenForce CuCa no controle da mancha-aureolada do cafeeiro. Os autores relataram redução de 41% no controle na severidade desta bacteriose em experimento no campo. Monteiro et al. (2013) verificaram que o GreenForce CuCa, aplicado a 168 hai com *H. vastatrix*, apresentou eficiência de 67,5%, quando comparado à testemunha, o que pode ter ocorrido pela associação de indutores naturais de resistência contidos nesta formulação, apresentando-se como uma excelente opção para o manejo dessa doença.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar as proteínas com diferença na abundância relativa (separadas por 2-DE seguida de MS) de plantas de cafeeiro tratadas com os indutores de resistência GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup>, e infectadas com o fungo *H. vastatrix*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras/Portugal.

### **2.1 Material vegetal e condições de crescimento**

Para a formação de mudas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo, pertencente à linhagem 379/19, sementes foram adquiridas da Estação Experimental da Epamig, Centro Tecnológico do Sul de Minas, Lavras, MG.

As sementes foram germinadas como descrito no capítulo 2.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia da UFLA, com variação de temperatura entre 18 a 27 °C, sendo irrigadas diariamente. Ao atingir cinco pares de folhas totalmente expandidas, com cerca de seis meses de idade, as plantas foram transferidas para uma câmara climatizada tipo Fitotron (Eletrolab – São Paulo/Brasil), em condições controladas de temperatura (24 °C) e fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente, 30 dias antes do início do experimento, para aclimação às condições ambientais do ensaio.

### **2.2 Tratamento com indutor de resistência**

A formulação GreenForce CuCa foi processada na Universidade Federal de Lavras, sendo a mesma utilizada na dosagem de 5mL L<sup>-1</sup>. O composto éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadizole-7-carbotióico, um derivado do benzotiadiazole (acibenzolar-S-metil, ASM) comercialmente denominado de Bion<sup>®</sup>, foi utilizado como controle positivo na concentração de 0,2g L<sup>-1</sup>, para a

indução de resistência em cafeeiros. Amostras de folhas jovens totalmente expandidas foram lavadas com água destilada, antes de serem pulverizadas com os indutores (superfície abaxial do 1º par de folhas). Como controle, foram utilizadas folhas pulverizadas com água destilada. Antes de cada coleta, as folhas foram lavadas em água destilada. As amostras foram coletadas às 0, 72, 120 e 168 horas após o tratamento (Fig.1) e guardadas individualmente em papel alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer, a -80 °C, para posterior extração das proteínas. O experimento foi montado utilizando-se o delineamento em blocos casualizados, com quatro tratamentos e três repetições, sendo cada repetição composta por três mudas da cultivar Mundo Novo com, aproximadamente, 6 meses de idade, perfazendo um total de 144 mudas.

### **2.3 Obtenção do inóculo de *Hemileia vastatrix* e inoculação de cafeeiros**

Folhas naturalmente infectadas com *H. vastatrix* foram coletadas em lavouras cafeeiras no município de Lavras, MG. Posteriormente, os urediniósporos foram retirados das folhas mediante raspagem, utilizando-se um pincel de ponta macia (nº 1).

Para a inoculação, foi preparada uma suspensão de urediniósporos de *H. vastatrix*, na concentração de  $1,85 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> urediniósporos, determinada em câmara de Neubauer, contendo dispersante Tween 20 (0,05%) (SALUSTIANO et al., 2008). A viabilidade do inóculo foi testada em lâminas escavadas contendo água destilada e mantidas no escuro por 14 horas, nas mesmas condições do experimento após a inoculação. Após 72 horas de pulverização com os indutores de resistência, as mesmas folhas foram inoculadas com uma suspensão de urediniósporos. Como controle foram utilizadas amostras de folhas inoculadas. As amostras foram coletadas às 48 e às 96 horas após inoculação

(Fig. 1) e, em seguida, acondicionadas individualmente em papel alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer, a -80 °C, para posterior extração das proteínas.

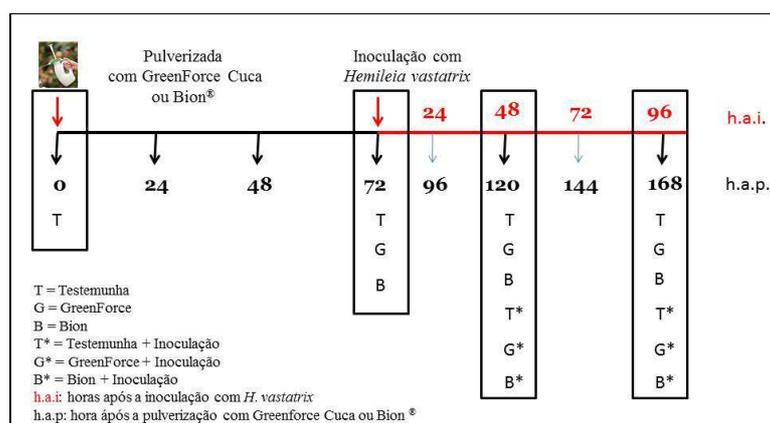


Figura 1 Esquema com o delineamento experimental dos tratamentos efetuados (Greenforce, Bion® e inoculação com *Hemileia vastatrix*) e respectivos tempos de coleta (em preto, as horas após pulverização e em vermelho, as horas após inoculação com *H. vastatrix*) das amostras de folhas de *C. arabica* Mundo Novo. Como testemunhas foram utilizadas folhas tratadas com água (T) e/ou inoculadas (T\*)

#### 2.4 Preparação, obtenção e purificação do extrato proteico

Dois pares de folhas jovens totalmente expandidas para cada tratamento foram coletados e as proteínas totais extraídas por precipitação com 10% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA)/acetona contendo 0,07% (v/v) de β-mercaptoetanol, baseado no protocolo descrito por Damerval et al. (1986). O extrato proteico foi preparado conforme citado no capítulo 2. A coleta foi realizada no mês de fevereiro do ano de 2013.

Trinta microgramas de amostra proteica (pellet) foram ressuspensas em 750 μL de tampão 2% SDS; 30 mM Tris-HCl pH 8,8 e 50 mM DDT. A solubilização das

proteínas foi realizada por agitação, primeiro no vortex (1 min) e, depois, em movimentos oscilatórios (25 osc/min), durante 2 horas (com agitação no vortex a cada 30 minutos). As amostras foram posteriormente centrifugadas a 12.000 g/15 min, de modo a obter um sobrenadante limpo. Aproximadamente 600 µL do sobrenadante foram purificados utilizando-se o 2-D Clean-up Kit (GE Healthcare). Após purificação, as amostras foram guardadas em tampão 30 mM Tris-HCl pH 8,3, 7M ureia, 2M tiourea e 4% CHAPS, a -80 °C, até serem utilizadas.

## 2.5 Quantificação das proteínas

A quantificação da concentração proteica das diferentes amostras foi estimada pelo método de Bradford, adaptado para placas de ELISA e modificado por Ramagli (1999) para 2-DE, usando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). A absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro de ELISA (modelo UVM340). As análises foram realizadas em triplicata, tanto para os pontos da reta de calibração como para as amostras. A concentração da proteína nas amostras foi determinada a partir da reta padrão ( $R^2 \geq 0,98$ ), linear para uma gama de proteínas entre 1-10 µg mL<sup>-1</sup>.

## 2.6 Eletroforese bidimensional - 2-DE

O IEF foi realizado em tira *IPG DryStrips* pH 4-7 de 18 cm, em que foram aplicadas 300 µg de proteína, 1,7 µl de IPG buffer (gradiente de pH 4-7) e 4 µl de *DeStreak*. A corrida foi realizada num equipamento *IPGphor Ettan IEF* (GE Healthcare), a 20 °C, com uma corrente de 50 µA por strip, de acordo com os seguintes protocolos: 100 V – 2h – *Step – n – hold*; 30 V - 10h – *Step – n – hold*; 150 V – 3h – *Step – n – hold*; 300 V - 3h – *Step – n – hold*; 1.000 V – 6h – Gradiente; 1.000 V – 1h – *Step – n – hold*; 8.000 V – 4h – Gradiente; 8.000 V –

3.200 V/h – *Step – n – hold* e 100 V - 18h – *Step-n-hold*. As tiras foram armazenadas a -20 °C, até o seu uso.

Para a realização da segunda dimensão, as tiras de gel foram acondicionadas individualmente em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 7,5 mL de tampão de equilíbrio<sup>1</sup> com 1% (p/v) de ditiotreitol (DTT). Após a agitação, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, a solução de cada tubo foi substituída por 7,5 mL de tampão de equilíbrio contendo 2,5% (p/v) de iodoacetamida. Nessa solução, as tiras ficaram em agitação por mais 15 minutos. Após o equilíbrio, as tiras foram colocadas no topo de um gel de poliacrilamida *DALT GEL* 12,5%, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). A separação das proteínas processou-se em condições desnaturantes em aparelho de eletroforese *Ettan DALT six* (GE Healthcare), à temperatura de 25 °C, com potência total 1,5 W por gel, até o fim da corrida (aproximadamente 22 horas).

### **2.7 Coloração com *Coomassie Blue Coloidal G-250***

Os géis foram fixados em solução contendo 10% de ácido acético e 40% de etanol, por um período mínimo de 30 minutos. Em seguida, esta solução foi descartada e os géis foram colocados em solução aquosa de azul de Coomassie coloidal, composta por *Coomassie Blue G-250* 0,1% (m/v), sulfato de amônia 10% (m/v), ácido fosfórico 1,2% (v/v) e metanol 20% (v/v), para corar, durante 7 dias, seguindo protocolo da GE Healthcare, modificado por Neuhoff et al. (1988). Antes da obtenção da imagem (Image Scanner I GE Healthcare), os géis foram lavados duas vezes com água destilada para retirar o resíduo do corante.

---

<sup>1</sup>50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6M ureia; 30% glicerol; 2% SDS; azul de bromofenol

## 2.8 Análise dos géis

Utilizou-se o *software* de análise de imagens de géis 2D, *Progenesis Same Spot 2D software v.s. 4.5* (Nonlinear Dynamics, Waters), para selecionar o gel com maior número de *spots* e com melhor qualidade para ser padrão de referência, sendo este utilizado para alinhar todos os géis do ensaio.

Para a obtenção dos *spots* com alteração na sua abundância, os géis das amostras controle (folhas tratadas com água e/ou inoculadas) foram comparados com os géis das amostras tratadas (GreenForce CuCa, Bion<sup>®</sup> e inoculadas). Foi escolhido um gel de referência para fazer o alinhamento dos *spots* de todos os géis. O alinhamento foi gerado tanto automaticamente como manualmente em decorrência das deformidades intrínsecas de cada gel. Só foram considerados para a análise os *spots* que estavam presentes nas três repetições biológicas de cada tratamento e que tinham o *spot* com *fold change* > 1,5.

Para o tratamento estatístico dos valores normalizados das proteínas, o *software* SISVAR foi utilizado para a análise de variância e a comparação de médias pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## 2.9 Identificação das proteínas por espectrometria de massa (MS)

Após análise das imagens, os *spots* mais abundantes e visíveis foram excisados manualmente dos géis e colocados numa microplaca de sequenciamento com 96 poços. As microplacas foram enviadas para o *Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann* (Luxemburgo), para análise por *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry*, ou MALDI-TOF/TOF-MS e *liquid chromatography-mass spectrometry*, ou LC-MS/MS. O cruzamento da informação das massas dos polipeptídios obtidas por MS com a informação disponível em bases de dados genômicas (NCBI e

*ESTCoffee*) permitiu identificar as proteínas. Esta etapa do trabalho foi realizada pela Dr.<sup>a</sup> Jenny Renaut, responsável da plataforma de Proteômica do CRP-Gabriel Lippmann.

A espectrometria de massa foi realizada utilizando-se o MALDI-TOF/TOF-MS/MS e LC-MS/MS, para determinar e comparar as massas de peptídeos geradas por digestão com tripsina. Os parâmetros utilizados foram: **modificação fixa**, realizada por carbamidometil e **modificação variável**, por desoxidação, metilação, oxidação e transformação do triptofano em cinurenina; **valores de massa**, monoisotópicos; **massa das proteínas**, sem restrição; **tolerância à massa dos peptídeos**,  $\pm 150$  ppm; **tolerância à massa dos fragmentos**,  $\pm 0,75$  Da; **máximo de locais não hidrolisados**, dois.

#### 2.10 Processamento adicional dos dados

As proteínas identificadas foram subsequentemente analisadas utilizando-se várias ferramentas de bioinformática. A informação de base foi obtida usando os bancos de dados InterProt, UniProt e NCBI. O ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (MW) teórico foram determinados utilizando-se o *software ExPASy Molecular Biology Server* (<http://web.expasy.org/protparam/>) (WALKER et al., 2005). A anotação funcional das proteínas identificadas foi realizada com base na *Gene Ontology Annotation* (GO; <http://www.geneontology.org>), utilizando-se os *softwares Blast2GO* versão 2.7.2 (<http://www.blast2go.de/>) (CONESA; GÖTZ, 2008) e o *Mercator Automated Sequence Annotation Pipeline* (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/app/mercator>) (LOHSE et al., 2014).

### 3 RESULTADOS

O presente estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar as proteínas cuja abundância relativa variou significativamente após a pulverização com os indutores de resistência GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup> e/ou a inoculação com o patógeno *H. vastatrix*. Serão apresentados e discutidos os resultados das proteínas identificadas para os tempos 72 e 120 horas após a pulverização (hap) com os indutores de resistência ou 48 horas após a inoculação (hai) com *H. vastatrix*. As amostras dos restantes tempos (168h/96h) ainda estão sendo analisadas.

Foram realizadas diferentes comparações, tais como testemunha x testemunha inoculada, às 120h; GreenForce CuCa x GreenForce CuCa inoculadas, às 120h; Bion<sup>®</sup> x Bion<sup>®</sup> inoculadas, 120h; testemunha x GreenForce CuCa x Bion<sup>®</sup>, 120h; testemunha x GreenForce CuCa x Bion<sup>®</sup>, 120h todas inoculadas; (Testemunha x GreenForce CuCa x Bion<sup>®</sup> 120h) x (testemunha x GreenForce CuCa x Bion<sup>®</sup> 120h todos inoculadas); testemunha x GreenForce CuCa x Bion<sup>®</sup> 72h e (testemunha x GreenForce CuCa x Bion<sup>®</sup> 72h) x (testemunha x GreenForce CuCa x Bion<sup>®</sup> 120h).

Após separação das proteínas por 2-DE e análise dos géis (tal como previamente mencionado), foram excisados 108 *spots*, tendo-se obtido identificação significativa para 65 *spots* (Fig. 2 e Tabela 1).

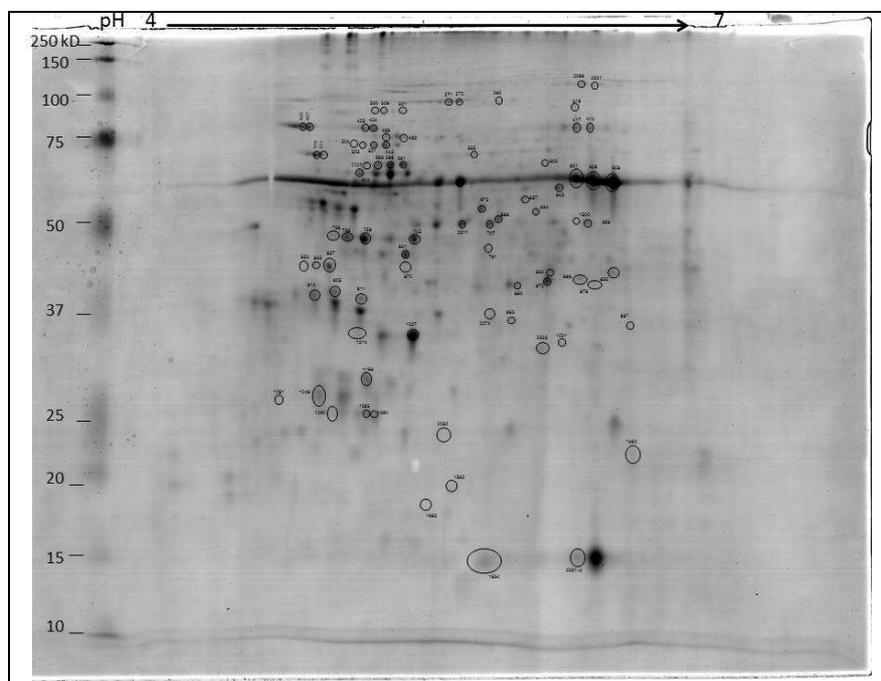


Figura 2 Gel 2-DE corado com *Colloidal Coomassie Blue G-250*, representando proteínas diferencialmente expressas de folhas cafeeiro após o tratamento com indutores de resistência GreenForce CuCa ou Bion® e/ou após a inoculação com *H. vastatrix*. Os números indicados na imagem correspondem aos *spots* das proteínas isoladas do gel e subsequentemente identificadas por MALDI-TOF/TOF – MS (maiores detalhes, ver tabela 1)

As proteínas que variaram na abundância relativa foram identificadas neste estudo e pertencem a 37 superfamílias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Tabela 1), sendo as mais representadas HSP70 (5 spots), *Chlorophyll A-B binding protein superfamily* (5 spots) e ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) subunidade maior e menor (4 spots). A anotação funcional das proteínas que diferiram na abundância (programa Mercator e Blast2GO – Fig. 3) permitiu verificar que as proteínas ligadas ao metabolismo fotossintético representavam

52%; as proteínas de estresse abiótico/biótico, 13%; envolvidas no metabolismo das proteínas (síntese, degradação, alvo e ligação a cofatores), 12%, seguidas de glicólise, 4%, e proteínas com atividade oxidativa/redutora, 4%.

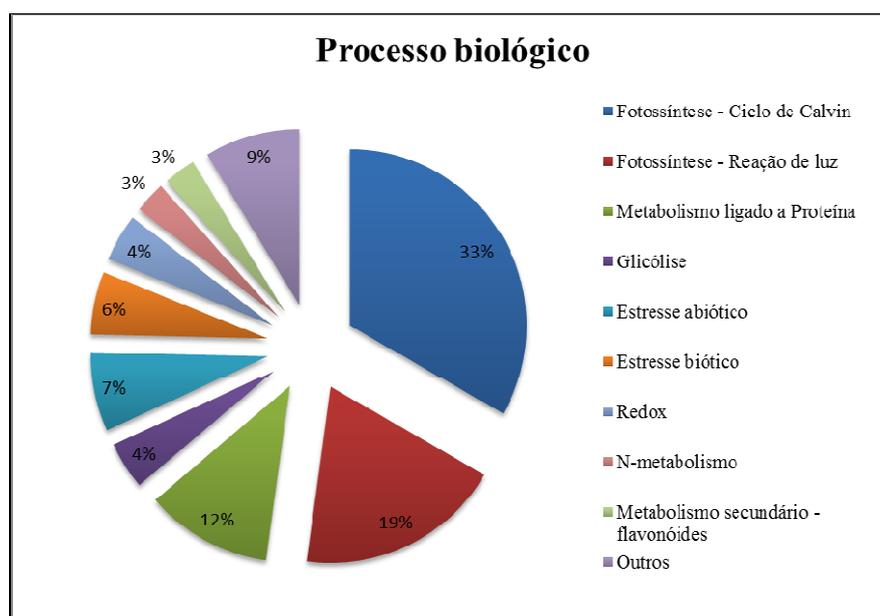


Figura 3 Anotação funcional do processo biológico das proteínas totais de folhas de café que diferiram na abundância após os tratamentos com o indutor de resistência, utilizando os *softwares* Mercator e Blast2GO. (maiores detalhes, ver Tabela 1)

### 3.1 Efeito do tratamento com indutores de resistência

A comparação dos perfis proteicos 2-DE das amostras de folhas tratadas com GreenForce CuCa, Bion<sup>®</sup> e com água (testemunha), nos tempos 72h e 120h, revelou um total de 35 *spots*, cuja abundância relativa variou entre as amostras. Quase metade dos *spots* apresentou maior abundância em pelo menos um tratamento GreenForce CuCa ou Bion<sup>®</sup>, quando comparado com a testemunha.

Nas amostras tratadas com GreenForce CuCa, a maior parte dos *spots* (30 *spots*) diminuiu de abundância, sugerindo uma inibição no metabolismo ligado a fotossíntese, estresse abiótico, proteínas (síntese, degradação, alvo e ligação a cofatores), glicólise e metabolismo secundário. No entanto, para 5 *spots*, foi observado um aumento significativo de abundância das proteínas *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit* (*spot* 1934), *sedoheptulose-bisphosphatase* (*spot* 853), *oxygen-evolving enhancer protein* (*spot* 2282), *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase* (*spot* 756) e *chloroplast photosynthetic water oxidation complex* (*spot* 1014). Estas proteínas estão envolvidas em diferentes etapas do metabolismo fotossintético (Fig.4).

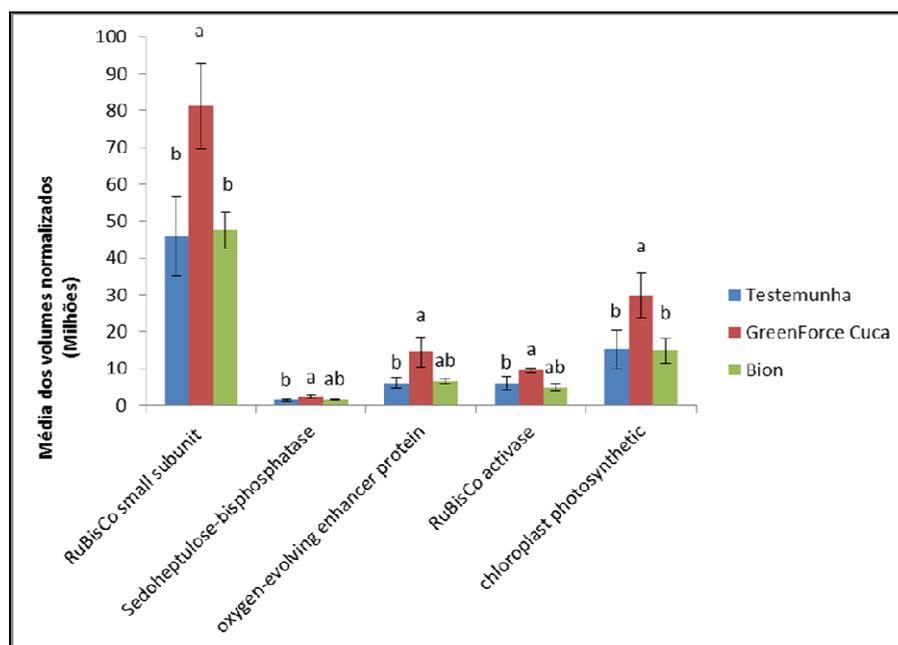


Figura 4 Nível da alteração na abundância de proteínas totais de folhas de café após o tratamento com os indutores de resistência. Os resultados mostram as proteínas mais abundantes após tratamento com o GreenForce CuCa, comparado com a testemunha e Bion®

Em resposta ao tratamento com Bion<sup>®</sup>, um total de 16 spots teve diferença na abundância relativa, em comparação com a testemunha. Metade das proteínas foi mais abundante, dentre elas, *aconitate hydratase* (spot 2321); *ATP-dependent zinc metalloprotease* (spot 505); *thioredoxin H-type* (spot 1662); *chlorophyll A/B binding protein*; HSP70 (spot 405); *chlorophyll a/b* (spot 1285) e *transketolase* (spot 414) (Fig. 5). Estas proteínas estão envolvidas em diferentes metabolismos, como via das pentoses fosfato (OPP), metabolismo das proteínas (síntese, degradação, alvo e ligação a cofatores), *redox* e ciclo do ácido cítrico (TCA) ou ciclo de Krebs. A outra metade das proteínas, cuja abundância diminuiu, também está envolvida em diferentes metabolismos, como a fotossíntese (ciclo de Calvin e fotoquímica), o transporte de elétrons mitocondrial, o estresse abiótico e o metabolismo ligado à proteína (síntese, degradação, alvo e ligação a cofatores).

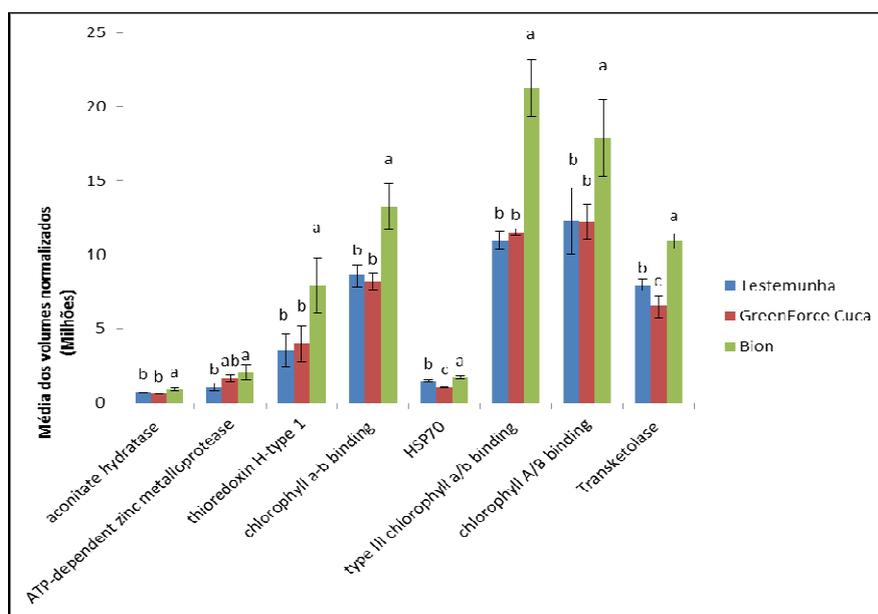


Figura 5 Nível da alteração na abundância de proteínas totais de folhas de cafeeiro após o tratamento com os indutores de resistência. Os resultados mostram as proteínas com maior abundância após tratamento com o Bion<sup>®</sup>, comparado com a testemunha e GreenForce CuCa

### 3.2 Efeito dos indutores de resistência às 72hap comparado ao das 120hap

Um total de 34 proteínas apresentou diferença, quando comparados os perfis proteicos das folhas tratadas com GreenForce CuCa, Bion<sup>®</sup> e testemunha (folhas tratadas com água), às 72hap e às 120hap (6 amostras). As proteínas com maior abundância nesta análise estão relacionadas com a fotossíntese ou com o metabolismo ligado às proteínas (síntese, dobramento e alvo). No que diz respeito à fotossíntese, foram identificadas proteínas do Ciclo de Calvin, reações fotoquímicas, síntese de ATP, via das pentoses fosfato, por exemplo, RuBisCo subunidade maior, clorofila a/b e *sedoheptulose-bisfosfato*. Em relação ao metabolismo ligado às proteínas, foram identificados, por exemplo, proteínas *elongation factor* e choque térmico (HSP70).

Quando comparadas as amostras de cada um dos tratamentos, obtidas às 72hap com as obtidas às 120hap, isto é, testemunha 72 x 120, GreenForce CuCa 72 x 120 e Bion 72 x 120, foram encontrados 15 spots diferencialmente expressos. Alguns spots foram comuns para as três amostras, tais como *phosphoglycerate mutase (spot 555)* e *predicted Zn-dependent peptidases (spot 600)* (a expressão diminuiu ao longo do tempo nas três amostras) e *quitinase (spot 914)* (a expressão aumentou ao longo do tempo nas três amostras) (Fig.6). As proteínas *triose phosphate isomerase (spot 2323)* e *sedoheptulose-bisphosphatase (spot 855)* são diferencialmente expressas, mas o seu aumento ou diminuição dependem da amostra/tratamento.

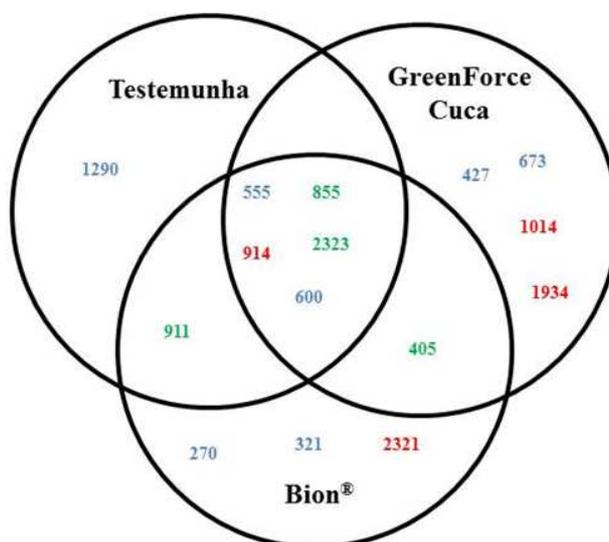


Figura 6 *Spots* referente às proteínas que tiveram diferença na abundância ao longo do tempo, após a pulverização com os tratamentos (T72 x T120 e G72 x G120 e B72 x B120). *Spots* azuis diminuíram a abundância ao longo do tempo. *Spots* vermelhos aumentaram a abundância ao longo do tempo. *Spots* verdes, o aumento ou a diminuição da abundância dependem da amostra/tratamento (maiores detalhes sobre os *spots*, ver Tabela 1)

No caso da amostra testemunha (folhas pulverizadas com água), observou-se alteração na abundância de 7 *spots* ao longo do tempo. Quatro *spots* foram menos abundantes e três *spots* mais abundantes. Proteínas como quitinase (*spot* 911, 914) e *triose phosphate isomerase* (*spot* 2323) aumentaram sua expressão das 72hap para as 120hap (Fig. 7). São proteínas envolvidas no estresse e na glicólise, respectivamente.

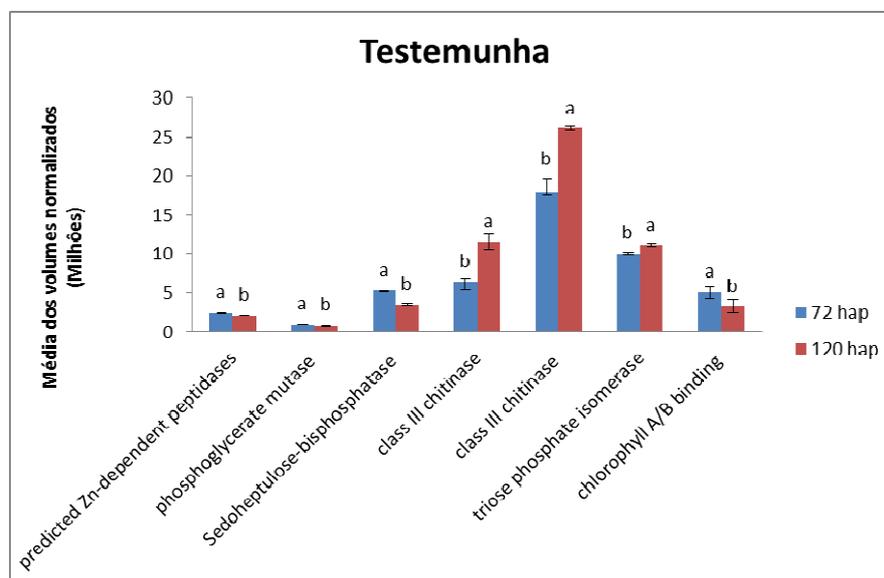


Figura 7 Nível da alteração na abundância, quando comparados os perfis proteicos das folhas de cafeeiro pulverizadas com água (Testemunha), às 72hap e às 120hap

Quando se comparam as folhas pulverizadas com GreenForce CuCa ao longo do tempo, pode-se observar que metade (5 *spots*) das proteínas diminuiu sua abundância às 120hap (Fig. 8). Quatro destas proteínas tiveram o mesmo comportamento quando foram tratadas com Bion<sup>®</sup> e apenas a proteína *triose phosphate isomerase* (*spot* 2323) teve desempenho inverso entre os tratamentos; esta proteína diminuiu a sua abundância às 120hap com GreenForce e aumentou após 120hap com Bion<sup>®</sup>. As proteínas RuBisCO subunidade menor (*spot* 1934), *chloroplast photosynthetic* (*spot* 1014), *sedoheptulose-biphosphatase* (*spot* 855) e quitinase (*spot* 914) aumentaram a sua abundância às 120hap em, pelo menos, um dos tratamentos. No caso das duas últimas proteínas citadas, foram mais abundantes para ambos os tratamentos (GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup>).

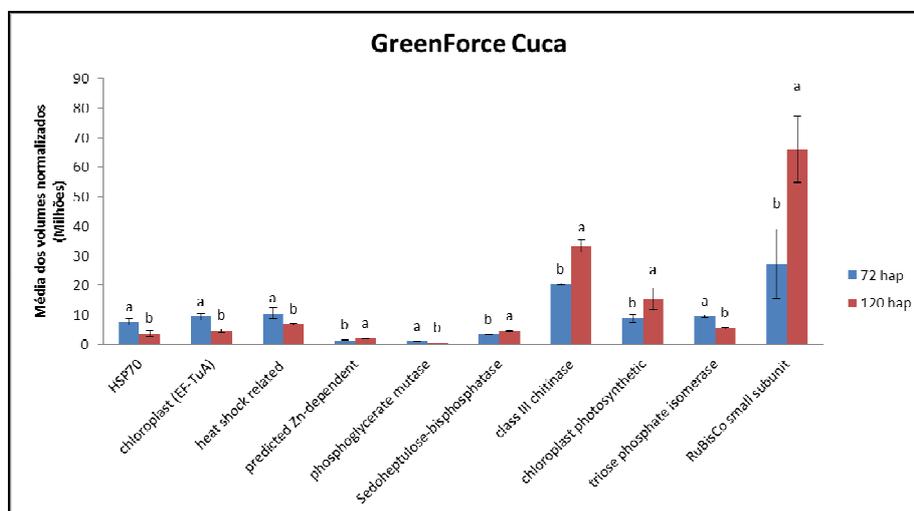


Figura 8 Nível da alteração na abundância, quando comparados os perfis proteicos das folhas de cafeeiro pulverizadas com GreenForce CuCa, às 72 hap e às 120 hap

Nas folhas pulverizadas com Bion<sup>®</sup> foram detectados 10 spots que tiveram diferença na abundância ao longo do tempo (Fig. 9). As proteínas quitinase (spot 914), *triose phosphate isomerase* (spot 2323), *sedoheptulose-bisphosphatase* (spot 855) e *aconitate hydratase* (spot 2321) aumentaram a sua abundância às 120 hap. Proteínas envolvidas em estresse abiótico, fotossíntese, glicólise e metabolismo ligado às proteínas (síntese, degradação, alvo, e ligação a cofatores) diminuíram sua abundância após cinco dias de pulverização do produto.

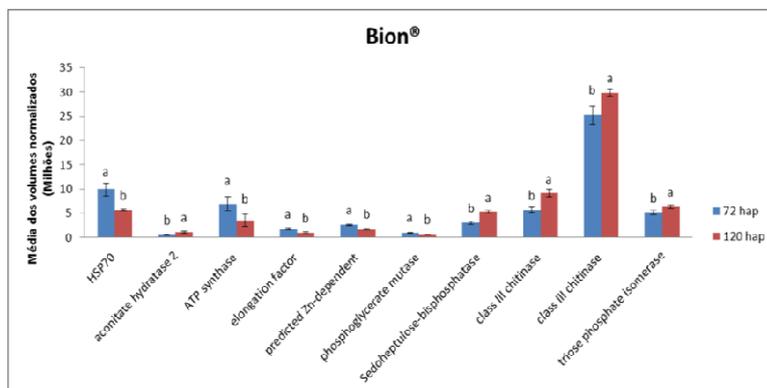


Figura 9 Nível da alteração na abundância, quando comparados os perfis proteicos das folhas de café pulverizadas com Bion®, às 72 hap e às 120 hap

### 3.3 Plantas inoculadas x plantas não inoculadas

Um total de oito *spots* apresentou diferença na abundância entre as amostras testemunhas (pulverizadas com água) e as amostras pulverizadas com água e inoculadas, tendo seis desses *spots* sido identificados por MS (Fig. 10). Todos os *spots* apresentaram maior abundância nas folhas testemunhas quando comparadas com as inoculadas. Três dessas proteínas estão envolvidas no metabolismo fotossintético. São elas *RuBisCO large subunit-binding protein (spot 581.)*, *chloroplastic-like (spot 791)* e *ATP synthase CFI alpha subunit, partial (spot 596)*; em seguida, estão as responsáveis pelo metabolismo das proteínas, *FtsH extracellular protease (spot 498)*; redox, *quinone oxidoreductase-like protein (spot 791)*; as responsáveis por estresse abiótico, *HSP70 (spot 404)* e, ainda, uma *galactinol-sucrose galactosyl transferase (spot 260)*.

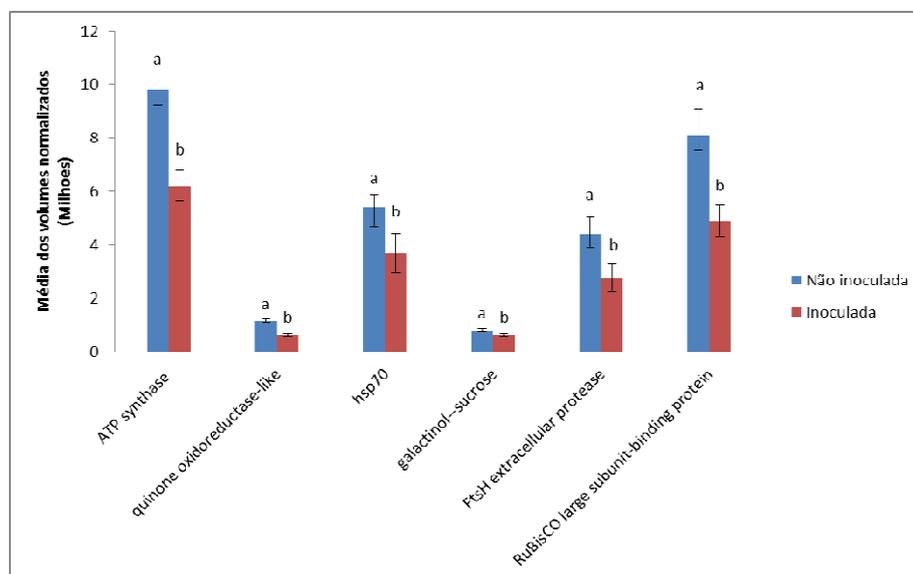


Figura 10 Nível da alteração na abundância das proteínas totais de folhas de cafeeiro inoculadas e não inoculadas

### 3.4 Efeito da inoculação em folhas tratadas com indutores de resistência

Tal como aconteceu para a testemunha, quando se comparam as folhas tratadas x tratadas e inoculadas, todos os *spots* que tiveram diferença na abundância relativa apresentaram uma diminuição na abundância após a inoculação, exceto um único *spot* no caso do tratamento com Greenforce. Para as folhas tratadas com Bion® e inoculadas com o patógeno, 16 *spots* foram diferencialmente expressos, tendo sido identificados 14 *spots* por MS (Fig. 11). Dessas proteínas, 80% estão envolvidas na fotossíntese. São elas, *transketolase* (*spot* 417); *RuBisCo carboxylase/oxygenase* subunidade maior (*spot* 626); *RuBisCo carboxylase/oxygenase* activase (*spots* 745 e 758); *phosphoglycerate kinase* (*spot* 684); *Sedoheptulose-bisphosphatase* (*spot* 857); *oxygen-evolving enhancer* (*spots* 2282 e 1007); *plastid RuBisCo carboxylase/oxygenase* subunidade menor (*spot* 2331-A); *Photosystem II* (*spot* 870); *Photosystem I* (*spot* 1362) e *chlorophyll a/b* (*spot* 1285).

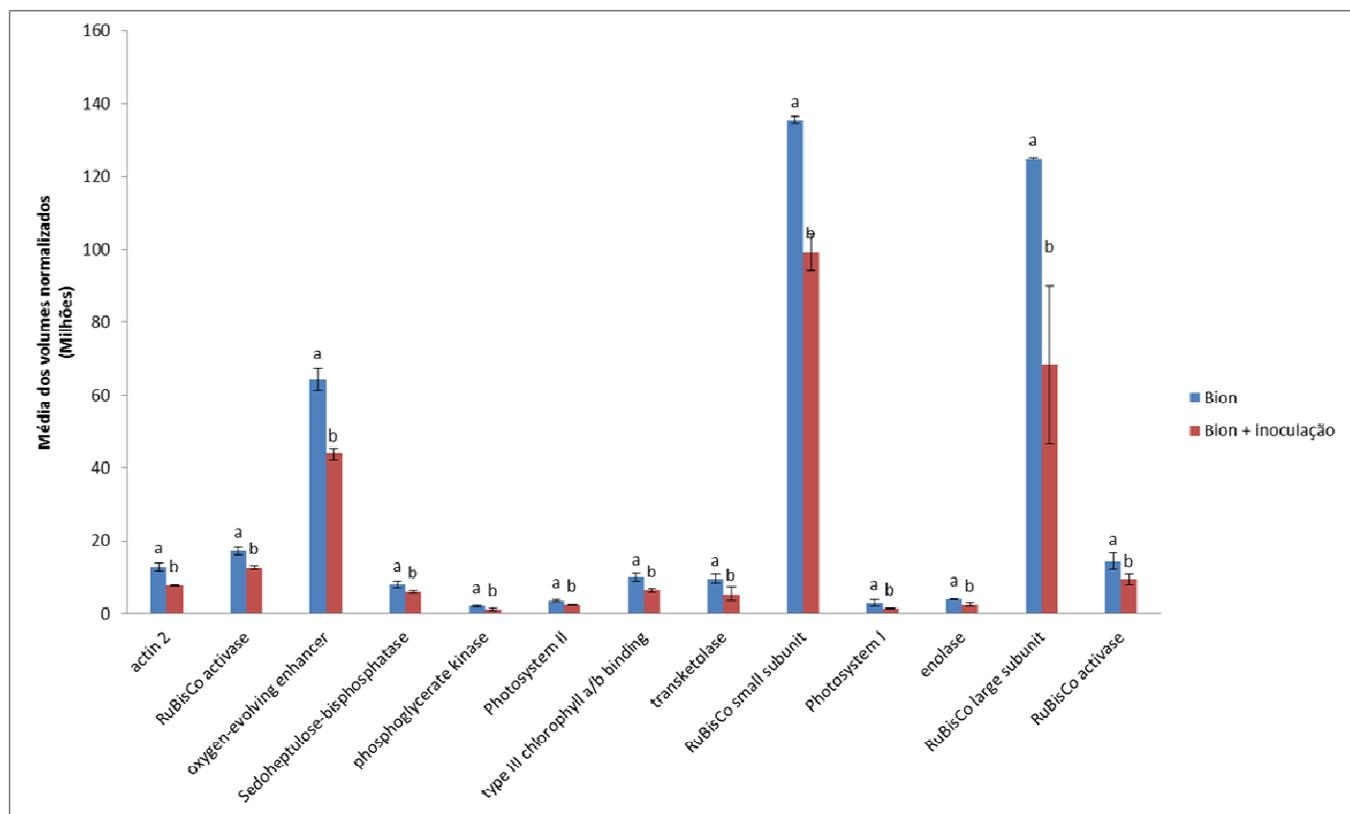


Figura 11 Nível da alteração na abundância de proteínas totais de folhas de cafeeiro tratadas com o indutor de resistência Bion<sup>®</sup>, inoculadas e não inoculadas

No caso das folhas tratadas com GreenForce CuCa, um total de seis *spots* foi detectado com uma diferença na abundância relativa após inoculação; quatro *spots* foram identificados por MS (Fig. 12). As proteínas foram caracterizadas, quanto à sua anotação funcional, como proteínas fotossintéticas, *oxygen-evolving enhancer* (*spot* 2282), *probable fructose-bisphosphate aldolase* (*spot* 850); glicólise, *phosphoglycerate mutase* (*spot* 555) e metabolismo secundário, *phenylcoumaran benzylic ether reductase* (*spot* 872). Apenas a proteína *oxygen-evolving enhancer* (*spot* 2282) se destacou pelo aumento da sua expressão após a inoculação com *H. vastatrix*.

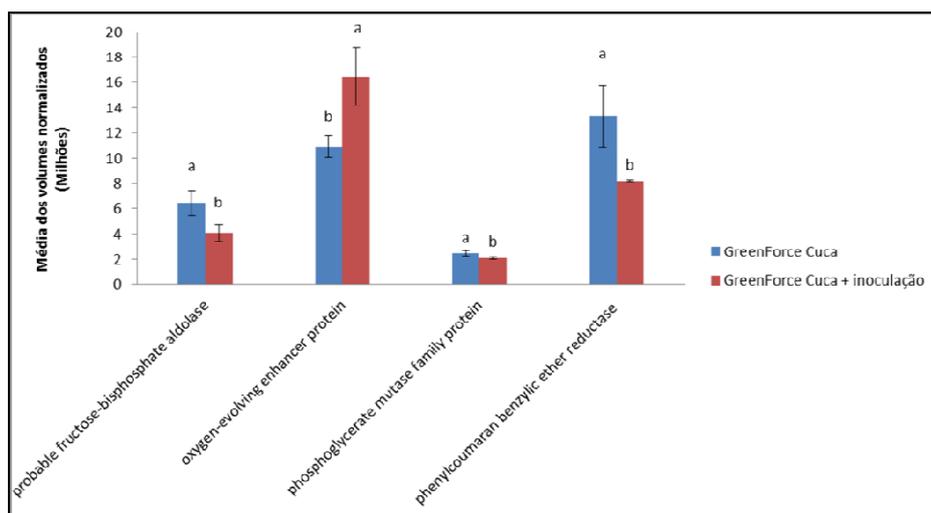


Figura 12 Nível da alteração na abundância de proteínas totais de folhas de cafeeiro tratadas com o indutor de resistência GreenForce CuCa, inoculadas e não inoculadas

#### 4 DISCUSSÃO

Este trabalho permitiu identificar proteínas que tiveram uma alteração na abundância relativa em folhas de cafeeiro, após pulverização com os indutores de resistência GreenForce CuCa ou Bion<sup>®</sup> e/ou inoculadas com *H. vastatrix* (interação compatível). Cerca de 50% dessas proteínas foram classificadas como estando envolvidas no metabolismo fotossintético, em particular no Ciclo de Calvin e em reações fotoquímicas.

Entre as proteínas cuja abundância relativa aumentou após o tratamento com GreenForce CuCa, a maioria está envolvida na fotossíntese. Uma das respostas da planta, ao ser exposta a um estresse, é a regulação negativa da fotossíntese, ou seja, a energia do metabolismo primário é desviada e usada para as respostas de defesa (ROJAS et al., 2014).

Fernandes (2014) estudou a ação de outro indutor de resistência, nomeado Fortaleza, sobre a resistência de mudas de café, ao serem infectadas com *Cercospora coffeicola*. Este indutor de resistência mostrou ser eficiente em manter a taxa fotossintética constante durante e após um período de ataque do patógeno. O autor sugere que, para a indução de resistência se expressar em bom nível, é necessário que a taxa fotossintética da planta se mantenha, mesmo quando sujeita a algum tipo de estresse, e esta é uma hipótese do nosso estudo, qual seja a de que o GreenForce CuCa aumenta a eficiência fotossintética.

Com relação à comparação de folhas inoculadas x folhas não inoculadas, houve uma diminuição generalizada das proteínas, cuja abundância foi alterada. Resultados semelhantes ao deste estudo foram obtidos por Castillejo et al. (2010), ao discutirem o comportamento do padrão observado na interação compatível e incompatível de *M. truncatula* x *U. striatus*. Estes autores observaram que proteínas fotossintéticas, como *RuBisCo* subunidade maior e menor, *RuBisCo activase* e *ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase*, foram as que mais se

alteraram, dominando o perfil 2-DE de genótipos de *M. truncatula* após a inoculação com o fungo. Proteínas como a *RuBisCo* *activase* e a subunidade menor diminuíram nos três genótipos, especialmente 24hai. Este perfil em análise do tecido foliar também tem sido relatado por outros autores em soja e girassol (CASTILLEJO et al., 2008; SOBHANIAN et al., 2010).

De acordo com Häusler et al. (2009), a diminuição das proteínas fotossintéticas após a infecção pode estar ligada com a sinalização do açúcar em plantas inoculadas no nível transcricional. Como relatado durante anos, tem sido sugerido que o papel do metabolismo primário durante as interações planta-patógeno é apoiar as necessidades energéticas celulares para a resposta de defesa da planta (BOLTON, 2009; KANGASJARVI et al., 2012). O balanço energético favorável para a defesa é feito à custa da desativação de genes envolvidos em outras vias, como genes envolvidos na fotossíntese, ao ser desafiada por patógenos virulentos e avirulentos, bem como indutores de resistência (ROJAS et al., 2014). Apesar de as reações de luz da fotossíntese gerar ROS, o que poderia funcionar como uma resposta de defesa, a regulação negativa da fotossíntese é contraintuitiva, no entanto, nenhuma evidência experimental está disponível para explicar por que isso acontece. Porém, dois possíveis mecanismos têm sido propostos: a supressão da fotossíntese ser regulada negativamente por efetores produzidos pelo patógeno ou essa regulação ser mediada por moléculas de açúcares que funcionariam como sinais negativos (ROJAS et al., 2014).

Outra proteína identificada neste estudo foi a tiorredoxina, que é conhecida por estar envolvida na regulação do estado redox das proteínas-alvo, por meio de reações de permuta de tiol-dissulfureto numa variedade de processos celulares, entre eles a fotossíntese (YAMAZAKI et al., 2004). Além disso, Tada et al. (2008) propuseram que as tiorredoxinas (TRX-5h) são reguladores positivos da resposta de defesa induzida em plantas, provavelmente por S-nitrosilação, que facilita a oligomerização prevenindo a depleção de proteínas.

Outra proteína envolvida na regulação da resposta a estímulos é a catalase (*spot* 621). Este *spot*, pelo fato de ter dupla identificação, não foi considerado nos resultados. No entanto, nas folhas tratadas com Bion, este *spot* aumenta em abundância às 120 hap. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Valente (2012), que observou o aumento da atividade da catalase (CAT) em mudas tratadas com indutores à base de extrato natural (NEFID) aplicado isoladamente e inoculadas com *H. vastatrix*, às 12, 72, 192, 216 e 240 hap. O aumento da atividade desta enzima também pode ser observado tanto para os tratamentos inoculados com *Cercospora coffeicola* como para os tratamentos não inoculados, utilizando os indutores de resistência Fortaleza e Priori Xtra, e a associação dos dois produtos (FERNANDES, 2014). A catalase é mencionada como envolvida num dos primeiros mecanismos de respostas de defesa/estresse em plantas e, por isso, é uma proteína que poderia ser candidata a marcador de resistência induzida, obtida com os tratamentos aqui neste estudo.

As plantas desenvolveram a capacidade de responder a estresses bióticos e abióticos, graças à sua regulação genômica, proteômica e metabolômica. Em condições de estresse, as proteínas podem perder a sua estrutura, afetando a sua atividade/função. Então, é essencial para uma planta conseguir manter a homeostasia celular sob condições estressantes (AGHDAM et al., 2013). A elucidação dos mecanismos de resposta das plantas ao estresse e como ela adquire resistência é absolutamente relevante para programas de melhoramento genético.

As chaperonas são responsáveis pelo dobramento, translocação e degradação em uma ampla variedade de proteínas envolvidas em vários processos biológicos de uma célula. As chaperonas ajudam a estabilizar as proteínas de membranas e também podem ser responsáveis pela conformação (dobramento dos polipeptídeos) sob condições de estresse. Muitas destas proteínas foram identificadas como proteína de choque térmico (HSPs) (WANG et al., 2004). As Hsp70 foram descritas, pela primeira vez, como proteínas induzidas pelo calor, mas, subsequentemente, foram

reconhecidas como proteínas que se expressam sob diversas condições de estresse (FIETTO et al., 2007).

Análise do perfil de expressão do gene Hsp70 em *Arabidopsis* e espinafre demonstra que os membros das chaperonas Hsp70 são expressos em resposta a condições de estresses ambientais, tais como calor, frio e seca, bem como outros estresses, como o químico (GUY; LI, 1998; LIN et al., 2001). No presente estudo, folhas de café foram expostas a pulverizações com indutores de resistência e inoculação com *H. vastatrix*, e houve uma diferença de expressão das proteínas relacionadas à família Hsp70. Quando as folhas foram tratadas com os indutores de resistência, a abundância das proteínas relacionadas a esta família diminuiu a expressão, comparada à testemunha, no entanto, quando as folhas eram pulverizadas e, posteriormente, desafiadas pelo patógeno, o tratamento com Bion<sup>®</sup> aumentou a expressão, diferente do tratamento com GreenForce CuCa que se manteve mais baixo que a testemunha.

O resultado apresentado neste estudo define algumas bases para futuras investigações, caracterizando plenamente a função de cada proteína aqui encontrada, pertencente à família Hsp, uma vez que apresentam respostas distintas, o que pode ser explicado pelas características dos produtos aqui utilizados, assim como os diferentes efeitos em função da sua formulação, como sugerido por Fietto et al. (2007) na identificação e análise *in silico* de genes da família Hsp em Citrus.

Neste estudo de indução de resistência em folhas de café contra a ferrugem, esperava-se encontrar algumas proteínas com diferença na abundância relacionada à patogênese (PRPs). Tais proteínas, geralmente, são induzidas por agentes patogênicos e algumas delas são mais abundantes em resposta a alguns produtos químicos que atuam de forma semelhante à infecção do patógeno. Elas exibem características bioquímicas distintas, que são necessárias quando a planta se encontra sob algum tipo de estresse, seja ele biótico ou abiótico (SINHA et al., 2014). O apoplasto é o principal local de acúmulo das PRPs, mas também é encontrado em

vacúolos (VAN LOON et al., 2006), o que poderia justificar o não aparecimento de muitas PRPs neste estudo, uma vez que a extração realizada aqui foi de proteínas totais, o que dificulta a visualização de proteínas menos abundantes na análise da diferença de abundância entre os tratamentos aqui utilizados.

Alguns estudos já vêm mostrando que a superexpressão de genes de quitinase aumenta a resistência de plantas a patógenos. Esta proteína é uma hidrolase (PR-3, 4, 8 e 11), que é uma enzima capaz de degradar a parede celular de muitos fungos e, por isso, pode funcionar como inibidora do crescimento fúngico (VAN LOON et al., 2006). Alteração na expressão do gene da quitinase já foi verificada de modo distinto em folhas de cafeeiro tratadas com dois diferentes indutores de resistência, Bion<sup>®</sup> ou NEFID (extrato de folhas de café coletado em campo (*Coffea arabica*), a partir da superfície do solo) (CARDOSO, 2009). Esta autora observou que folhas tratadas com Bion<sup>®</sup> induziam este gene mais rapidamente (24 e 48hap) que folhas tratadas com NEFID. No entanto, a expressão aumentava gradativamente com o tempo após a aplicação de NEFID (192; 216 e 264hap), inversamente proporcional ao que acontece com a aplicação com Bion<sup>®</sup>, corroborando, em parte, com o presente trabalho, apesar de terem sido estudados apenas dois tempos (72 e 120hap). A aplicação de NEFID em tomateiro também demonstra um aumento da atividade do gene quitinase de 72h a 120h (MEDEIROS et al., 2010).

Guzzo (2004) relata, em seu trabalho, que o uso de Bion<sup>®</sup> induz o aumento local e sistêmico da atividade enzimática da quitinase em *C. arabica* cv. Mundo Novo, atingindo seu ponto máximo aos setes dias após a pulverização com o indutor de resistência. O presente trabalho indica que o uso de GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup> auxilia o aumento da abundância relativa de proteínas em cafeeiro cv. Mundo Novo, reforçando a hipótese de que essa PR-proteína pode ter uma função importante na indução de resistência do cafeeiro a patógenos. O indutor GreenForce CuCa tem em sua composição casca de grãos

de café, o que pode justificar o aumento da abundância de quitinase, uma vez que esta proteína também foi identificada em outro estudo e identificada como o primeiro alérgeno encontrado em grãos de café (MANAVSKI et al., 2012).

Para o desenvolvimento de plantas resistentes a estresse e às doenças, tem sido comprovada, experimentalmente, a utilidade dos genes de proteínas-PR. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para a elucidação dos mecanismos de regulação gênica, assim como dos receptores, da cascata de transdução de sinais e alvos moleculares envolvidos na indução de proteínas-PR, para que, na prática, seja possível o lançamento de cultivares resistentes a várias doenças.

Sabe-se que a proteína *oxygen-evolving enhancer* é um importante componente do complexo *oxygen-evolving* do fotossistema II. Apesar de uma investigação biofísica intensiva do mecanismo pelo qual esta proteína mantém a integridade do complexo PSII, o assunto ainda permanece sem solução (BUSHEVA et al., 2012). Neste estudo, esta proteína foi a única que teve sua abundância aumentada após a pulverização com o indutor GreenForce CuCa após a inoculação, o que sugere que este produto conserva a sua taxa de síntese, provavelmente pela presença de cálcio em sua composição, auxiliando, assim, a manutenção da integridade do complexo PSII.

Até a presente data, não há relatos de trabalho do proteoma e que verifiquem a diferença na abundância em proteínas totais de folhas do cafeeiro após a pulverização com os indutores de resistência GreenFoce CuCa e Bion<sup>®</sup> e, posteriormente, a inoculação com o fungo *H. vastatrix*. Porém, alguns trabalhos com diferentes indutores de resistência e patossistema puderam auxiliar na discussão dos resultados aqui encontrados.

## 5 CONCLUSÕES

A caracterização das proteínas que tiveram diferença na abundância relativa de folhas de café tratado com os indutores de resistência, GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup>, pôs em evidência modificações em diversos processos biológicos.

Estes são os primeiros resultados obtidos no nível do proteoma das folhas de café após tratamento com os indutores de resistência GreenForce CuCa e Bion<sup>®</sup>. Dos resultados obtidos, algumas proteínas podem ser potenciais candidatas a marcadores de indução de resistência, como tioredoxina, catalase, HSP70 e *oxygen-evolving enhancer*. Outros estudos necessitam ser realizados (como, por exemplo, interação incompatível), de modo a verificar o envolvimento destas proteínas na resposta de resistência do café à ferrugem.

## ANEXO

Tabela 1 Anotações das proteínas totais identificadas em folhas de cafeeiro

Processo biológico <sup>a</sup>	Spot <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>	Superfamília <sup>d</sup>	Valores teóricos <sup>e</sup>		Número de acesso <sup>f</sup>	Atividade enzimática <sup>g</sup>
				pI	MW		
<i>cell.organisation.cytoskeleton</i>	704	actin 2, partial [ <i>Carica papaya</i> ]	<i>Nucleotide-Binding Domain_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily</i>	5,34	23,8574	425872892	-
	555	Phosphoglycerate mutase family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	<i>Alkaline phosphatase homologues superfamily</i>	5,4	61,1814	224140653	<i>Isomerases</i>
<i>glycolysis.cytosolic branch.</i>	645	Enolase, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	<i>TIM_phosphate_binding superfamily</i>	5,62	47,9364	255575355	<i>Lyases</i>
	2323	Triose phosphate isomerase cytosolic isoform-like protein [ <i>Capsicum annuum</i> ]	<i>TIM_phosphate_binding superfamily</i>	5,72	27,094	390098824	<i>Isomerases</i>
<i>'hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated' minor CHO</i>	878	PREDICTED: probable aldo-keto reductase 2-like [ <i>Citrus sinensis</i> ]	<i>Aldo-keto reductases (AKRs) superfamily</i>	6,34	37,7271	568868403	-
<i>metabolism.raffinose family.raffinose synthases.known'</i>	260	PREDICTED: galactinol--sucrose galactosyltransferase [ <i>Vitis vinifera</i> ]	<i>Alpha amylase catalytic domain superfamily</i>	5,54	85,2481	225452378	<i>Transferases</i>
<i>'mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear'</i>	319	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 1, mitochondrial [ <i>Prunus mume</i> ]	<i>NADH-G superfamily</i>	5,72	66,1855	645246428	<i>Oxidoreductases</i>
<i>'N-metabolism.ammonia metabolism.glutamine synthetase'</i>	707	Plastid glutamine synthetase 2 [ <i>Spinacia oleracea</i> ]	<i>Gln-synt (glutamine synthase)superfamily</i>	6,04	47,3816	154017627	<i>Ligases</i>
	2311	Plastid glutamine synthetase 2 [ <i>Spinacia oleracea</i> ]	<i>Gln-synt (glutamine synthase)superfamily</i>	6,04	47,3816	154017627	<i>Ligases</i>
<i>'OPP.non-reductive PP.transketolase'</i>	414	Transketolase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	<i>TPP (thiamine pyrophosphate)-enzymes superfamily</i>	6,34	80,6573	508704351	<i>Transferases</i>
	417	Transketolase family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	<i>TPP (thiamine pyrophosphate)-enzymes superfamily</i>	5,97	80,7162	224063766	<i>Transferases</i>
<i>Protein</i>	271	ATP-dependent clp protease [ <i>Cucumis melo subsp. melo</i> ]	<i>Clp superfamily</i>	6,78	103,3096	307136002	<i>Hydrolases</i>

Tabela 1, continuação...

Processo biológico <sup>a</sup>	Spot <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>	Superfamília <sup>d</sup>	Valores teóricos <sup>e</sup>		Número de acesso <sup>f</sup>	Atividade enzimática <sup>g</sup>
				pI	MW		
PS.calvin cycle	321	Elongation factor G [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	<i>EFG (elongation factor G) superfamily</i>	5,33	44,9453	62320893	-
	328	Elongation factor G [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	<i>EFG (elongation factor G) superfamily</i>	5,33	44,9453	62320893	-
	498	FtsH extracellular protease family isoform 2, partial [ <i>Theobroma cacao</i> ]	<i>FtsH Extracellular superfamily</i>	9,15	49,6248	508708033	<i>Hydrolases</i>
	504	FtsH extracellular protease family isoform 2, partial [ <i>Theobroma cacao</i> ]	<i>FtsH Extracellular superfamily</i>	9,15	49,6248	508708033	<i>Hydrolases</i>
	505	PREDICTED: ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 2, chloroplastic-like [ <i>Citrus sinensis</i> ]	<i>Peptidase_M41 superfamily</i>	4,62	12,4732	568829330	<i>Hydrolases</i>
	673	Chloroplast elongation factor TuA (EF-TuA) [ <i>Nicotiana sylvestris</i> ]	<i>ABC_ATPase superfamily</i>	6,09	49,7319	218310	-
	600	Predicted Zn-dependent peptidases	<i>Peptidase_M16 superfamily</i>	6,3	59,011	661893849	<i>Hydrolases</i>
	414	Transketolase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	<i>TPP (thiamine pyrophosphate)-enzymes superfamily</i>	6,34	80,6573	508704351	<i>Transferases</i>
	417	Transketolase family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	<i>TPP (thiamine pyrophosphate)-enzymes superfamily</i>	5,97	80,7162	224063766	<i>Transferases</i>
	576	PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic-like isoform X1 [ <i>Glycine max</i> ]	<i>Chaperonin_like superfamily</i>	5,23	61,7055	571489137	-
	581	PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic-like [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	<i>Chaperonin_like superfamily</i>	5,72	62,9921	460366131	-
	626	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [ <i>Coffea arabica</i> ]	<i>RuBisCO_large superfamily</i>	6,13	53,3536	116617116	<i>Lyases</i>

Tabela 1, continuação...

Processo biológico <sup>a</sup>	Spot <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>	Superfamília <sup>d</sup>	Valores teóricos <sup>e</sup>		Número de acesso <sup>f</sup>	Atividade enzimática <sup>g</sup>
				pI	MW		
	628	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [ <i>Coffea arabica</i> ]	<i>RuBisCO_large superfamily</i>	6,13	53,3536	116617116	<i>Lyases</i>
	684	Phosphoglycerate kinase (chloroplast) [ <i>Nicotiana benthamiana</i> ]	<i>Phosphoglycerate_kinase superfamily</i>	7,66	50,0838	313585890	<i>Transferases</i>
	688	Phosphoglycerate kinase (chloroplast) [ <i>Nicotiana benthamiana</i> ]	<i>Phosphoglycerate_kinase superfamily</i>	7,66	50,0838	313585890	<i>Transferases</i>
	699	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [ <i>Capsicum annuum</i> ]	<i>Gp-dh (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase) superfamily</i>	6,34	33,8618	18072799	<i>Oxidoreductases</i>
	745	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, partial [ <i>Pachysandra terminalis</i> ]	<i>ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domain superfamily</i>	5,55	34,5482	94549022	-
	756	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase, partial [ <i>Oryza sativa</i> Indica Group]	<i>ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domain superfamily</i>	4,78	21,6944	13569643	-
	758	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, partial [ <i>Pachysandra terminalis</i> ]	<i>ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domain superfamily</i>	5,55	34,5482	94549022	-
	759	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, partial [ <i>Pachysandra terminalis</i> ]	<i>ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domain superfamily</i>	5,55	34,5482	94549022	-
	801	Phosphoribulokinase, partial [ <i>Genlisea aurea</i> ]	<i>Nucleotide kinase superfamily</i>	5,5	41,9997	527194042	<i>Transferases</i>
	850	PREDICTED: probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic [ <i>Vitis vinifera</i> ]	<i>TIM_phosphate_binding superfamily</i>	8,13	42,9482	225427768	<i>Lyases</i>
	853	Sedoheptulose-bisphosphatase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	<i>FIG (FBPase/IMPase/glpX)-like superfamily</i>	6,55	42,3193	590562472	<i>Hydrolases</i>
	855	Sedoheptulose-bisphosphatase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	<i>FIG (FBPase/IMPase/glpX)-like superfamily</i>	6,55	42,3193	590562472	<i>Hydrolases</i>

Tabela 1, continuação...

Processo biológico <sup>a</sup>	Spot <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>	Superfamília <sup>d</sup>	Valores teóricos <sup>e</sup>		Número de acesso <sup>f</sup>	Atividade enzimática <sup>g</sup>
				pI	MW		
PS.lightreaction	857	Sedoheptulose-bisphosphatase [Theobroma cacao]	FIG (FBPase/IMPase/glpX)-like superfamily	6,55	42,3193	590562472	Hydrolases
	1500	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	CP12 superfamily	7,09	48,0508	470128381	Oxidoreductases
	1934	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit [Coffea arabica]	RuBisCO_small superfamily	8,49	20,3915	24940138	Lyases
	2331-A	Plastid ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit [Coffea arabica]	RuBisCO_small superfamily	5,88	13,8449	83375904	Lyases
	270	ATP synthase CF1 beta subunit (chloroplast) [Coffea arabica]	ATP_synthase superfamily	5,36	53,6665	116617115	-
	596	ATP synthase CF1 alpha subunit, partial [Potarophytum riparium]	ATP_synthase superfamily	5,27	55,5004	338825738	-
	866	PREDICTED: ATP synthase gamma chain, chloroplastic-like [Cucumis sativus]	ATP_synthase superfamily	8,46	40,814	449433954	-
	870	Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplast precursor, putative [Ricinus communis]	Photosynthesis system_II_BNR superfamily	7,11	43,4415	255559812	-
	1007	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic [Genlisea aurea]	MSP (manganese-stabilising protein)superfamily	6,48	34,6532	527190719	-
	1014	Chloroplast photosynthetic water oxidation complex 33kDa subunit precursor, partial [Morus nigra]	MSP (manganese-stabilising protein)superfamily	5,48	28,2668	152143640	-
	1249	Chlorophyll A/B binding protein [Gardenia jasminoides]	Chlorophyll A-B binding protein superfamily	5,28	28,1821	224381552	-
	1281	PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic-like [Vitis vinifera]	Chlorophyll A-B binding protein superfamily	5,24	28,824	225461315	-

Tabela 1, continuação...

Processo biológico <sup>a</sup>	Spot <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>	Superfamília <sup>d</sup>	Valores teóricos <sup>e</sup>		Número de acesso <sup>f</sup>	Atividade enzimática <sup>g</sup>
				pI	MW		
Redox	1285	Type III chlorophyll a/b binding protein [ <i>Gardenia jasminoides</i> ]	<i>Chlorophyll A-B binding protein superfamily</i>	6,32	29,6748	293337343	-
	1290	Type III chlorophyll a/b binding protein [ <i>Gardenia jasminoides</i> ]	<i>Chlorophyll A-B binding protein superfamily</i>	6,32	29,6748	293337343	-
	1294	Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	<i>Chlorophyll A-B binding protein superfamily</i>	5,33	28,7747	407970998	-
	1362	PREDICTED: photosystem I reaction center subunit II, chloroplastic isoform 1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	<i>PS_aD superfamily</i>	9,74	22,4808	225432620	-
	2282	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic-like [ <i>Glycine max</i> ]	<i>PsbP superfamily</i>	7,69	28,4468	574584759	-
	791	PREDICTED: quinone oxidoreductase-like protein At1g23740, chloroplastic-like [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	<i>MDR (Medium chain reductase/dehydrogenase superfamily)</i>	7,74	41,0011	460385950	<i>Oxidoreductases</i>
	983	Ascorbate peroxidase [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	<i>Plant_peroxidase_like superfamily</i>	5,43	27,3881	559005	<i>Oxidoreductases</i>
	1662	Thioredoxin H-type 1, partial [ <i>Nicotiana benthamiana</i> ]	<i>Thioredoxin_like superfamily</i>	5,56	13,2973	257222628	-
	872	Phenylcoumaran benzylic ether reductase [ <i>Eucalyptus globulus</i> subsp. <i>globulus</i> ]	<i>SDR (Short-chain dehydrogenases/reductases) superfamily</i>	5,53	33,8259	383081915	-
	880	Isoflavone reductase-like protein [ <i>Coffea arabica</i> ]	<i>SDR (Short-chain dehydrogenases/reductases) superfamily</i>	5,53	34,3763	255529745	-
'secondary metabolism.flavonoids.isoflavones.isoflavone reductase'	404	Hsp70 (AA 6 - 651), partial [ <i>Petunia x hybrida</i> ]	<i>Nucleotide-Binding Domain_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily</i>	5,06	70,782	20559	-
	405	HSP70 [ <i>Triticum aestivum</i> ]	<i>Nucleotide-Binding Domain_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily</i>	5,13	71,0305	2827002	-
	425	Heat shock protein 70 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	<i>Nucleotide-Binding Domain_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily</i>	5,13	77,1056	6746592	<i>Oxidoreductases</i>

Tabela 1, conclusão

Processo biológico <sup>a</sup>	Spot <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>	Superfamília <sup>d</sup>	Valores teóricos <sup>e</sup>		Número de acesso <sup>f</sup>	Atividade enzimática <sup>g</sup>
				pI	MW		
'stress.biotic'	427	PREDICTED: stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like [ <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ]	<i>Nucleotide-Binding Domain_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily</i>	5,07	74,9446	470142981	<i>Oxidoreductases</i>
	443	RecName: Full=Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial; Flags: Precursor [ <i>Pisum sativum</i> ]	<i>Nucleotide-Binding Domain_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily</i>	5,81	72,3008	585272	-
	905	Class III chitinase precursor, partial [ <i>Coffea arabica</i> ]	<i>GH_18_chitinase-like superfamily</i>	5,1	29,0086	296399179	-
	911	Class III chitinase precursor, partial [ <i>Coffea arabica</i> ]	<i>GH_18_chitinase-like superfamily</i>	5,1	29,0086	296399179	-
	914	Class III chitinase precursor, partial [ <i>Coffea arabica</i> ]	<i>GH_18_chitinase-like superfamily</i>	5,1	29,0086	296399179	-
	1560	PREDICTED: MLP-like protein 28 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	<i>SRPBCC superfamily</i>	5,35	17,0801	225424270	-
'TCA / org transformation.TCA.aconitase'	2321	PREDICTED: aconitate hydratase 2, mitochondrial [ <i>Vitis vinifera</i> ]	<i>Aconitase catalytic domain superfamily</i>	6,66	110,0564	225460961	<i>Lyases</i>
'transport.p- and v-ATPases'	442	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase A subunit [ <i>Citrus unshiu</i> ]	<i>ATPase superfamily</i>	6,16	35,6015	6721571	-

<sup>a</sup> Processo biológico de acordo com a classificação do Mercator Automated Sequence Annotation Pipeline.  
<sup>b</sup> Número que identifica os spots proteicos no gel 2-DE (Fig. 2)  
<sup>c</sup> Identificação dos peptídeos com base na homologia obtida com proteínas caracterizadas em *Coffea* sp. e em outras espécies por pesquisa através de BLASTp em bases de dados ESTCoffee  
<sup>d</sup> Superfamília de acordo com a classificação do NCBI, com base nos domínios conservados das proteínas.  
<sup>e</sup> Valores de massa molecular (MW) e ponto isoelétrico (pI) determinados pelo ExPASy Molecular Biology, a partir do número de acesso da proteína (GI acc. no.)  
<sup>f</sup> Número de acesso do GenBank, atribuído após análise por espectrometria de massa (MS/MS)  
<sup>g</sup> Identificação da atividade enzimática com base no EC identificado através do Blast2GO

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, A. A. et al. Influência de safras agrícolas e tratamentos fungicidas no café cereja descascado e bóia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1919-1925, 2009. Especial.

AMARAL, D. R. et al. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 425-431, 2008.

AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

AGHDAM, M. S. et al. Heat shock proteins as biochemical markers for postharvest chilling stress in fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 160, p. 54-64, 2013.

ANDRADE, C. C. L. et al. Formulação a base de subprodutos da cafeicultura no controle da cercosporiose do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 46., 2013, Ouro Preto. Anais... Ouro Preto: [s. n.], 2013. 1 CD ROM.

BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry huskson *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 535-537, 2005.

BOLTON, M. D. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 22, p. 487-497, 2009.

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotri chumlagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, mar./abr. 2004.

BUSHEVA, M. et al. Heat-induced reorganization of the structure of photosystem II membranes: Role of oxygen evolving complex. **Journal of Photochemistry and Photobiology - B**, Lausanne, v. 117, p. 214-221, 2012.

CARDOSO, D. C. **Análise quantitativa da expressão gênica de quitinase e peroxidase induzida por acibenzolar-S-metil e extrato vegetal em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CASTILLEJO, M. A. et al. Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves by 2DE gel electrophoresis and mass spectrometry. **The Open Proteomics Journal**, Beijing, v. 1, p. 59–71, 2008.

CASTILLEJO, M. A. et al. Two-dimensional gel electrophoresis-based proteomic analysis of the *Medicago truncatula*–rust (*Uromyces striatus*) interaction. **Annals of Applied Biology**, London, v. 157, p. 243–257, 2010.

CAVALCANTI, F. R. et al. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomona vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 408-417, 2006.

CAVALCANTI, F. R. et al. Natural extracts induce lignification on cocoa and tomato leaves. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...**Lavras: UFLA, 2004. p. 107.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 1, p. 1-13, 2008.

DAMERVAL, C. et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 7, p. 52-54, 1986.

FERNANDES, L. H. M. **Atividade antioxidante em cafeeiro e proteção contra a cercosporiose por indutor de resistência e fungicidas**. 2014. 69 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

FERNANDES, L. H. M. et al. Acibenzolar-S-Metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 24-32, jan./mar. 2013

FIETTO, L. G. et al. Identification and *in silico* analysis of the *Citrus* HSP70 molecular chaperone gene Family. **Genetic Molecular Biology**, São Paulo, v. 30, n. 3, 2007. Suppl.

GUY, C. L.; LI, Q. B. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 539–556, 1998.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GUZZO, S. D. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n.1, p. 89-94, 2001.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to '*Hemileia vastatrix*'. I. partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 377-385, 1987.

HÄUSLER, R. E. et al. Chlororespiration and grana hyperstacking: how an *Arabidopsis* double mutant can survive despite defects in starch biosynthesis and daily carbon export from chloroplasts. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 149, p. 515–533, 2009.

KANGASJARVI, S. et al. Photosynthesis, photorespiration, and light signaling in defence responses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 619–1636, 2012.

LIN, B. L. et al. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. **Cell Stress Chaperones**, Cham, v. 6, p. 201–208, 2001.

LOHSE, M. et al. Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 37, p. 1250-1258, 2014.

MANAVSKI, N. et al. Cof a 1: identification, expression and immunoreactivity of the first coffee allergen. **International Archives of Allergy Immunology**, Basel, v. 159, p. 235–242, 2012.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V. Proteção induzida por benzotriazolone contra Ferrugem-Alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciências e agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1103-1106, set./out. 2002.

MARTINS, E. M. et al. Ação protetora do Acibenzolar-S-Metil (Bion) em plantas de cafeeiro contra ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 24., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 1998. p. 177-178.

MARTINS, S. A. et al. Produtos alternativos no controle da mancha aureolada do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 8., 2013, Salvador. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2013. Disponível em: <[http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb\\_anais/134.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/134.pdf)>. Acesso: 13 fev. 2014.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 30, p. 1-9, 2010.

MONTEIRO, A. C. A. et al. **Fosfitos e formulações à base de subprodutos das indústrias de café e da lavoura de citros no manejo da ferrugem do cafeeiro**. 2013. Disponível em: <[http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb\\_anais/205.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/205.pdf)>. Acesso em: 13 fev. 2014.

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, p. 1594–1605, 2006.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 9, p. 255–262, 1988.

NOJOSA, G. B. A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arábica* L. a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. e *Phoma costarricensis* Echandi**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. 215 p.

RAMAGLI, L. S. Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 112, p. 99-103, 1999.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: Denmark, 2004. p. 79.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, 2002.

ROJAS, C. M. et al. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, Bethesda, v. 5, p. 17, Feb. 2014.

SALUSTIANO, M. E. et al. Variabilidade em dez populações de *Hemileia vastatrix* em relação à germinação e ao comprimento do tubo germinativo em quatro temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1651-1656, 2008.

SINHA, M. et al. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. **The Scientific World Journal**, New York, v. 1, p. 19, 2014.

SOBHANIAN, H. et al. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. **Proteome Science**, London, v. 8, p. 19, 2010.

TADA, Y. et al. Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. **Science**, Washington, v. 321, p. 952–956, 2008.

VALENTE, T. C. T. **Expressão gênica e atividade de catalase e fenilalanina amônia liase ativadas por indutores de resistência em cafeeiro**. 2012. 68 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

VAN LOON, L. C. et al. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopatholog**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

WALKER, J. et al. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. Totowa: Humana, 2005.

WANG, W. et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 1. 9 n. 5, p. 244-252, May 2004.

YAMAZAKI, D. et al. Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, p. 18–27, 2004.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*C. arábica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 165-180.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese caracterizou-se o proteoma de folhas do cafeeiro, sendo referência para estudos futuros em plantas crescidas em outras condições ambientais, submetidas a diferentes tipos de estresses biótico ou abiótico.

Os resultados apontados nesta tese mostraram que, no tratamento com o GreenForce CuCa, houve alteração nas proteínas envolvidas na fotossíntese e no estresse/defesa. No caso do Bion<sup>®</sup>, o aumento foi detectado em proteínas ligadas à fotossíntese, à respiração e ao estresse/defesa. Nas amostras inoculadas foi observada uma diminuição generalizada das proteínas em todos os tratamentos (G, B e Testemunha) após a infecção. O fato de apenas termos um tempo de análise (48hai) e trabalhar com uma interação compatível, pode justificar em parte estes resultados. São necessários mais tempos após a pulverização com os indutores e após a inoculação com *H. vastatrix*, acompanhando as fases de infecção do patógeno, para uma melhor compreensão das alterações a que estão sujeitas as folhas sob estresse.

Foram evidenciadas alterações na abundância relativa, em particular nas proteínas envolvidas no metabolismo energético (fotossíntese e respiração) e estresse/defesa, o que sugere alterações ao nível do metabolismo primário. Este estudo poderá servir de ponto de partida para trabalhos futuros, no que diz respeito à pesquisa de outras proteínas/genes (vias metabólicas) envolvidos na resposta de resistência/defesa induzida.

O uso dos indutores de resistência, na tentativa de verificar se o seu efeito é local ou sistêmico, também tratará uma ampla gama de proteínas que diferem na sua abundância, assim como utilizar uma cultivar que seja resistente à ferrugem poderá auxiliar a compreensão da interação planta x patógeno.