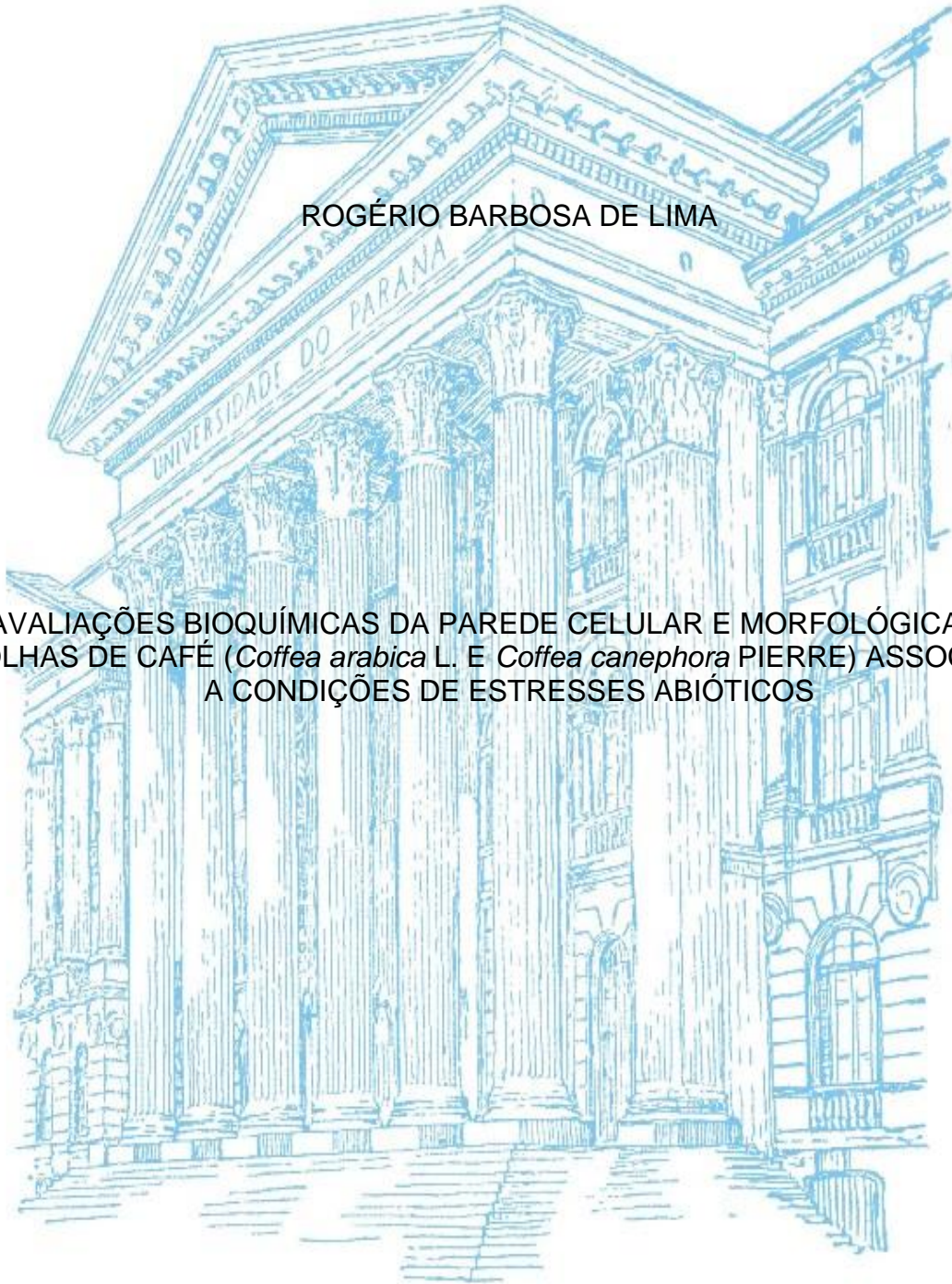


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROGÉRIO BARBOSA DE LIMA

AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS DA PAREDE CELULAR E MORFOLÓGICAS DE  
FOLHAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. E *Coffea canephora* PIERRE) ASSOCIADAS  
A CONDIÇÕES DE ESTRESSES ABIÓTICOS



CURITIBA  
2013

ROGÉRIO BARBOSA DE LIMA

AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS DA PAREDE CELULAR E MORFOLÓGICAS DE  
FOLHAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. E *Coffea canephora* PIERRE) ASSOCIADAS  
A CONDIÇÕES DE ESTRESSES ABIÓTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências - Bioquímica da  
Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dra. Carmen Lúcia de  
Oliveira Petkowicz

CURITIBA  
2013

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Lima, Rogério Barbosa de

Avaliações bioquímicas da parede celular e morfológicas de folhas de café (*Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre) associadas a condições de estresses abióticos./ Rogério Barbosa de Lima – Curitiba, 2013.  
141f.: il. ; 30cm.

Orientador: Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1.Parede celular. 2.Café. 3. Coffea. 4. Polissacarídeos. I. Título II. Petkowicz, Carmen Lúcia de Oliveira. III.Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

ROGÉRIO BARBOSA DE LIMA

**Alterações bioquímicas da parede celular e morfológicas de folhas de café (*Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre) associadas a condições de estresses abióticos.**

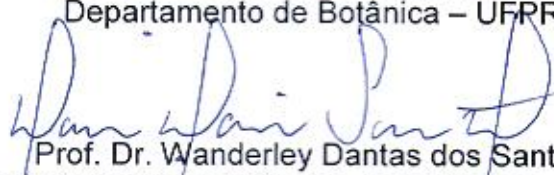
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Regina Torres Boeger  
Departamento de Botânica – UFPR



Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos  
Departamento de Ciências Agrônômicas – UEM



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Bello Baron Maurer  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Angela Pierre Vitória  
Centro de Biociências e Biotecnologia – UENF

Curitiba, 06 de fevereiro de 2013

**Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente para minha esposa  
Karla que furtei quase completamente a presença de esposo que merecia,  
durante este trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e em especial:

À minha esposa Karla que mesmo distante estava diariamente comigo me ouvindo, incentivando e deixando a certeza de que tudo estava valendo a pena.

À minha orientadora Prof. Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz por ter confiado em mim e participado do meu crescimento científico e pessoal. Por se disponibilizar a me orientar, participando do trabalho com sugestões e ideias.

Aos professores Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho e Dra. Maria de Lourdes Ferrarese pelo incentivo de iniciar o doutorado na UFPR e pelo bom exemplo de professores orientadores. Além da ajuda nas análises de lignina. Muito obrigado!

À Prof. Dra. Juliana Bello Baron Maurer por todas as discussões encantadoras durante avaliação e acompanhamento na banca interna desta tese. Muito obrigado por tornar este trabalho mais doce.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira e o Msc. Tiago Benedito dos Santos do IAPAR por aplicar os estresses nas plantas de café e nos ceder este material.

À Prof. Dra. Lucélia Donatti pelos ensinamentos e discussões nos experimentos de microscopia eletrônica.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCMC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelo uso dos equipamentos de microscopia eletrônica.

À Prof. Dra. Maria Regina Torres Boeger pelos experimentos de microscopia óptica.

À Prof. Dra. Joana Léa Meira Silveira pelos ensinamentos e motivação durante a realização deste trabalho.

À Rosecler a grande amiga de todos os momentos. Muito obrigado por me mostrar o caminho mais alegre e por fazer dar muito mais valor à amizade.

À Lúcia minha colega de laboratório por todos os ensinamentos práticos dos experimentos e das nossas boas conversas que permitiram dias muito mais alegres em Curitiba.

Ao Luciano por todos os empréstimos de materiais, parceiro de experimentos e de conversas na hora do café.

À Maíra Afonso pela parceria no laboratório e pelas ótimas conversas na hora do café.

Aos colegas de laboratório Marília e Rhayla, Heide, Marina, Nicole, Mariana, João, Monique e Regiane pelas ajudas nos experimentos e boas discussões e conversas no laboratório.

Aos colegas de laboratórios vizinhos pelos empréstimos de materiais e das sugestões de experimentos.

Ao meu grande colega indiano de pensionato Fareed Ahmed por todos os ótimos momentos que passamos juntos na casa 4. Espero que já tenha aprendido português suficiente para ler isso.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR.

À Elisângela pelas análises de HPSEC e pelas conversas.

À Rosane, por se disponibilizar a me ensinar e realizar as análises por GC.

Aos colegas professores da Universidade Estadual de Maringá Rogério Marchiosi, Anderson Soares e Wanderley Santos pelas discussões durante a elaboração dessa tese.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, representada pelo Prof. Miguel Daniel Nosedá e a todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao Departamento de Química da UFPR, pela utilização do FT-IR e da balança analítica. Em especial Grazielli, pela atenção, disponibilidade e auxílio no uso do FT-IR.

À CAPES, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho e no meu crescimento científico.

Muito obrigado.

**"Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente."  
Issac Newton**



## RESUMO

A parede celular é uma estrutura dinâmica e complexa, com papéis centrais no crescimento, desenvolvimento, fisiologia e defesa vegetal. Sua composição é alterada no crescimento, desenvolvimento e em condições de estresse. Os estresses abióticos são decorrentes de alterações nas condições químicas e físicas do ambiente da planta, diminuindo seu crescimento e podendo causar até sua morte. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações dos componentes da parede celular de folhas de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) submetidas aos estresses térmico, hídrico e salino. Frações de pectinas, hemiceluloses e lignocelulose foram isoladas e analisadas quanto à composição e distribuição de massa molecular. A ultraestrutura das células do mesófilo da folha também foi avaliada. Todos os estresses causaram alterações na composição da parede celular e na ultraestrutura das células da folha. Em todas as condições de estresses houve redução do conteúdo de amido no citoplasma e rupturas das membranas dos cloroplastos. Os estresses térmico e salino diminuíram o rendimento das frações polissacarídicas, aumento do tamanho médio dos polissacarídeos e aumento do conteúdo de lignina no resíduo final, alterações relacionadas ao enrijecimento da parede celular. Por outro lado, o estresse hídrico promoveu o afrouxamento da parede celular pelo aumento da solubilidade das frações polissacarídicas, redução do tamanho médios dos polissacarídeos e leve redução do conteúdo de lignina da fração lignocelulósica. A espécie de *C. canephora* tolerante (clone 14) e sensível (clone 109A) ao estresse hídrico foi investigada. O cultivar tolerante apresentou ao enrijecimento da parede celular em resposta ao estresse hídrico, enquanto o clone sensível respondeu afrouxando a parede celular. Estes resultados indicam que a maior resistência da parede celular seja uma importante característica que garante a maior tolerância ao estresse hídrico no clone tolerante.

Palavras chave: Parede celular. Polissacarídeos. Estresses Abióticos. Estresse Salino. Estresse Térmico. Estresse hídrico. *Coffea arabica*. *Coffea canephora*.

## ABSTRACT

The cell wall is a dynamic and complex structure to play a central role in growth, development, physiology and plant defense. Its composition is altered on growth, development and stress conditions. The abiotic stresses are deriving of alterations in chemical and physical conditions in environmental of plant, decreasing its growth and may induce until its death. The objective of this work was evaluated the change in cell wall components of leaves of coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) exposed to heat, drought and saline stress. Pectics, hemicellulosics and lignocellulosics fractions were isolated and analyzed its composition and molecular mass distribution. The leaves cells ultrastructure of mesophyll was also evaluated. All of stresses caused alteration in cell wall compositions and in cell wall ultrastructure of leaves. In all stresses conditions there were decreasing in cytoplasm starch content and membrane disruption of chloroplasts. The heat and saline stresses decreasing of yields of polysaccharides fractions, increasing of medium size of polysaccharides, and increasing in lignin content in final residue, alterations consistent with cell wall stiffening. On the other hand, the drought stress caused cell wall loosening by the increasing of solubility of polysaccharide fractions, decreasing of polysaccharide medium size, and slight decreasing of lignin content in lignocellulosic fraction. The *C. canephora* tolerance (clone 14) and sensible (clone 109A) specie to drought stress was also investigated. The tolerance cultivar showed features of stiffening in response to drought stress, while the sensible clone responded loosening the cell wall. These results may suggest that stiffening to play an important role that ensures the better tolerance to drought stress in tolerant clone.

Key-words: Cell Wall. Polysaccharides. Abiotic Stress. Saline Stress. Heat Stress. Drought Stress. *Coffea arabica*. *Coffea canephora*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- MODELOS DE ESTRUTURAS DA PAREDE PRIMÁRIA (ADAPTADO DE BUCHANAN <i>et al.</i> , 2000). .....	25
FIGURA 2- ESTRUTURA DAS PAREDES PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS (ADAPTADA DE PLOMION, LEPROVOST E STOKES (2001)) .....	26
FIGURA 3- PRINCIPAIS MONOMEROS QUE COMPÕEM A LIGNINA .....	27
FIGURA 4- MODELO REPRESENTANDO OS EFEITOS DA PERDA DE ÁGUA NA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR (ADAPTADO DE MOORE <i>et al.</i> (2008)). .....	33
FIGURA 5- FLUXOGRAMA DE TRABALHO .....	45
FIGURA 6- FLUXOGRAMA DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR DAS FOLHAS DE CAFÉ ( <i>C. arabica</i> E <i>C. canephora</i> ). .....	46
FIGURA 7- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC (C) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	55
FIGURA 8- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE R (C) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	59
FIGURA 9- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (C) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	61
FIGURA 10- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E DOS MONOLIGNOIS (B) DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	63

FIGURA 11- ESTRUTURAS MICROSCÓPICAS DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> : CONTROLE (100x) (A); APÓS CINCO DIAS DE ESTRESSE TÉRMICO (100x) (B); CONTROLE (200x) (C); E APÓS CINCO DIAS DE ESTRESSE TÉRMICO (200x) (D). .....	65
FIGURA 12- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> . CÉLULAS CONTROLE (A); APÓS CINCO DIAS DE ESTRESSE TÉRMICO (B); CLOROPLASTOS CONTROLE (C); E CLOROPLASTOS APÓS CINCO DIAS DE ESTRESSE TÉRMICO (D). .....	66
FIGURA 13- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (B) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....	83
FIGURA 14- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (B) DOS POLISSACARÍDEO EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....	84
FIGURA 15- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E DOS MONOLIGNOIS (B) DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....	86
FIGURA 16- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> . CÉLULAS CONTROLE (A); CÉLULAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE SEVERO (B); CLOROPLASTOS CONTROLE (C); E CLOROPLASTOS DE CÉLULAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE SEVERO. ....	87
FIGURA 17- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (C) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO. ....	70
FIGURA 18- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (C) DOS	

<p>POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO.....</p>	72
<p>FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM DE NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> CONTROLE (A) E SUBMETIDAS A 25 DIAS DE ESTRESSE SALINO (B).....</p>	74
<p>FIGURA 20- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (B) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO. ....</p>	75
<p>FIGURA 21- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E DOS MONOLIGNOIS (B) DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO. ....</p>	77
<p>FIGURA 22- ESTRUTURAS MICROSCÓPICAS DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i>: CONTROLE (100x) (A); 25 DIAS DE ESTRESSE SALINO (100x) (B); CONTROLE (200x) (C); E 25 DIAS DE ESTRESSE (200x).....</p>	79
<p>FIGURA 23- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i>. CÉLULAS CONTROLE (A); CÉLULAS SUBMETIDAS A 25 DIAS DE ESTRESSE SALINO (B); CLOROPLASTOS CONTROLE (C); E CLOROPLASTOS DE CÉLULAS SUBMETIDAS A 25 DIAS DE ESTRESSE SALINO (D-F).....</p>	80
<p>FIGURA 24- QUANTIFICAÇÃO DOS RFOs DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) E SENSÍVEL (CLONE 109A) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.....</p>	89
<p>FIGURA 25- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.....</p>	93
<p>FIGURA 26- ESPECTRO DE FT-IR DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....</p>	94

FIGURA 27- ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....	95
FIGURA 28- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM EDTA 2% (FRAÇÃO E) DAS FOLHAS DE <i>C.</i> <i>canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....	97
FIGURA 29- ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM EDTA 2% (FRAÇÃO E) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....	98
FIGURA 30- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....	100
FIGURA 31- ESPECTRO DE FT-IR DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....	101
FIGURA 32- ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE. ....	102
FIGURA 33- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO. ....	104

FIGURA 34- ESPECTRO DE FT-IR DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B), SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.....	105
FIGURA 35- ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L <sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.....	106
FIGURA 36- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.....	108
FIGURA 37- ESPECTRO DE FT-IR DOS POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.....	109
FIGURA 38- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14). CÉLULAS CONTROLE (A); CLOROPLASTOS CONTROLE (B); CÉLULAS DO ESTRESSE SEVERO (C); CLOROPLASTOS DO ESTRESSE SEVERO (D); CÉLULAS RECUPERADAS DO ESTRESSE HÍDRICO (E); E CLOROPLASTOS DE CÉLULAS RECUPERADAS DO ESTRESSE HÍDRICO (F). .....	111
FIGURA 39- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> SENSÍVEL (CLONE 109A). CÉLULAS CONTROLE (A); CLOROPLASTOS CONTROLE (B); CÉLULAS DO ESTRESSE SEVERO (C); CLOROPLASTOS DO ESTRESSE SEVERO (D); CÉLULAS RECUPERADAS DO ESTRESSE HÍDRICO (E); E CLOROPLASTOS DE CÉLULAS RECUPERADAS DO ESTRESSE HÍDRICO (F). .....	112





## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- RENDIMENTO (EM % <sup>a</sup> ) DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	53
TABELA 2- RENDIMENTO (EM % <sup>a</sup> ) DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.....	81
TABELA 3- RENDIMENTO (EM % <sup>a</sup> ) DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>C. arabica</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO.....	68
TABELA 4- RENDIMENTO (EM % <sup>a</sup> ) DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DAS FOLHAS DE <i>C. canephora</i> TOLERANTE (CLONE 14) E SENSÍVEL (CLONE 109A) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.....	90

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cv	- Cultivar
D <sub>2</sub> O	- Óxido de deutério
DMSO	- Dimetilsulfóxido
Fração A	- Fração péctica extraída de folhas de café com água a 30°C
Fração E	- Fração péctica extraída de folhas de café com EDTA 2% a 30°C
Fração H30	- Fração hemicelulósica extraída de folhas de café com NaOH 4 mol.L <sup>-1</sup> a 30°C
Fração H70	- Fração hemicelulósica extraída de folhas de café com NaOH 4 mol.L <sup>-1</sup> a 70°C
Fração R	- Fração lignocelulósica
FT-IR	- Espectroscopia no infravermelho incorporando transformador <i>Fourier</i>
GLC	- Cromatografia líquido-gasosa
HPLC	- Cromatografia líquida de alto desempenho
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alto desempenho
IAPAR	- Instituto Agronômico do Paraná
RFO	- Oligossacarídeos da família da rafinose
RGAs	- Ramnogalacturonanas
RGI	- Ramnogalacturonana I
RGII	- Ramnogalacturonana II
RI	- Índice de refração
RMN <sup>13</sup> C	- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13
UroA	- Ácidos urônicos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL .....	21
2.1.1 Parede celular primária.....	22
2.1.2 Parede celular secundária.....	25
2.2 ESTRESSES ABIÓTICOS.....	27
2.2.1 Estresses Hídrico, Salino e Térmico .....	28
2.2.2 Respostas aos estresses abióticos relacionadas à parede celular .....	32
2.3 GÊNERO <i>COFFEA</i> (CAFÉ) .....	36
<b>3 OBJETIVO</b> .....	<b>40</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 OBTENÇÃO DAS PLANTAS SUBMETIDAS AOS ESTRESSES ABIÓTICOS ....	41
4.1.1 Estresse hídrico.....	41
4.1.2 Estresse térmico.....	42
4.1.3 Estresse salino .....	43
4.2 MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA .....	43
4.3 EXTRAÇÕES DOS CARBOIDRATOS.....	44
4.3.1 Carboidratos de baixa massa .....	44
4.3.2 Polissacarídeos da parede celular .....	45
4.4 TRATAMENTO ENZIMÁTICO PARA REMOÇÃO DO AMIDO.....	47
4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC) .....	47
4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS MONOLIGNOIS .....	47
4.7 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS .....	48
4.8 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA .....	48
4.9 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTO DESEMPENHO (HPSEC).....	49
4.10 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO INCORPORANDO TRANSFORMADOR <i>FOURIER</i> (FT-IR) .....	50
4.11 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	50

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5.1 ESTRESSE TÉRMICO .....	52
5.1.1 Rendimento das frações de polissacarídeos.....	52
5.1.2 Polissacarídeos da fração W.....	54
5.1.3 Polissacarídeos das frações hemicelulósicas .....	57
5.1.4 Polissacarídeos e monolignóis da fração lignocelulósica .....	62
5.1.5 Microscopia óptica e eletrônica .....	64
5.2 ESTRESSE SALINO .....	67
5.2.1 Rendimento das frações de polissacarídeos.....	67
5.2.2 Polissacarídeos da fração W.....	68
5.2.3 Polissacarídeos das frações hemicelulósicas .....	71
5.2.4 Polissacarídeos e monolignóis da fração lignocelulósica .....	76
5.2.5 Microscopia óptica e eletrônica .....	78
5.3 ESTRESSE HÍDRICO.....	81
5.3.1 Rendimento das frações de polissacarídeos.....	81
5.3.2 Polissacarídeos das frações hemicelulósicas .....	82
5.3.3 Polissacarídeos e monolignóis da fração lignocelulósica .....	85
5.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	87
5.4 CLONES 14 E 109A DE <i>C. CANEPHORA</i> .....	88
5.4.1 Quantificação dos RFOs .....	88
5.4.2 Rendimento das frações de polissacarídeos.....	90
5.4.3 Polissacarídeos das frações pécticas .....	92
5.4.4 Polissacarídeos das frações hemicelulósicas .....	99
5.4.5 Polissacarídeos da fração lignocelulósica .....	107
5.4.6 Microscopia eletrônica.....	109
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>141</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os estresses abióticos causam inúmeras perdas na produção de plantas agriculturáveis diminuindo consideravelmente a produção mundial de alimentos. Entre os principais tipos de estresses abióticos, destacam-se os estresses térmico, salino e hídrico. Muitas pesquisas avaliam aspectos da fisiologia e bioquímica vegetal, porém pouca atenção tem sido dada a principal estrutura protetora e sustentadora da célula vegetal, a parede celular. À parede celular é a estrutura externa à membrana plasmática vegetal que é alterada durante o crescimento e desenvolvimento e também pode sofrer modificações durante os estresses abióticos. Assim, este trabalho avaliou as alterações dos componentes da parede celular durante os estresses térmico, salino e hídrico. A identificação e compreensão dos efeitos de cada um desses estresses nas plantas são importantes para permitir o desenvolvimento de mecanismos que possam impedir perdas na produtividade.

O cultivar de avaliação foi o café, sobretudo pelo seu grande valor comercial. O café é uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas mundialmente e é a *commodity* agriculturável mais importante no mundo, destacando-se o Brasil como maior produtor e exportador.

Existem duas principais espécies usadas na produção mundial de café, a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, correspondendo cerca de 70% e 30% da produção mundial, respectivamente. A *C. arabica* apresenta paladar mais apreciado enquanto que a *C. canephora* é mais resistente aos estresses. As folhas foram escolhidas neste estudo porque são os órgãos fundamentais na nutrição energética vegetal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular vegetal está presente externamente à membrana plasmática das células vegetais e tem por função primária a proteção e estruturação das células e dos tecidos vegetais (DOBLIN; PETTOLINO; BACIC, 2010). A sua estrutura é altamente organizada, forte, rígida e quase impenetrável, porém dinâmica e metabolicamente ativa, permitindo a troca de materiais e sinais entre as células (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). A sua forma, composição e propriedades são alteradas ao longo da vida celular em resposta ao crescimento (PEAUCELLE; BRAYBROOK; HÖFTE, 2012), diferenciação (ODA; FUKUDA, 2011), estresses bióticos (BISHOP *et al.*, 2002; HAMANN, 2012; UNDERWOOD, 2012) e abióticos (KONNO; NAKATO; TSUMUKI, 2003; ALBERSHEIM *et al.*, 2010).

As células vegetais destinam grande parte da energia proveniente da fotossíntese para a síntese, montagem e remodelamento da parede celular (REITER, 2002; SCHEIBLE; PAULY, 2004). A parede celular afeta a taxa e a direção do crescimento celular, exercendo profunda influência na forma celular, na textura do tecido e na forma final do órgão vegetal (CARPITA; MACCANN, 2002). Os seus principais componentes são os polissacarídeos, seguidos de proteínas e compostos aromáticos como a lignina (SHOWALTER, 1993). A concentração de cada um destes polímeros depende da espécie, do tipo, da idade, do órgão e até mesmo da região na parede celular em uma única célula (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Comumente a parede celular é categorizada em dois tipos: a parede celular primária e a parede celular secundária. As suas composições químicas e o período em que surgem no decorrer do desenvolvimento celular são as principais características para distingui-las (ALBERSHEIM *et al.*, 2010). A parede primária é produzida durante a divisão celular e aumenta sua área de superfície durante a expansão da célula. A parede secundária é formada na diferenciação celular, internamente à primária, resultando em uma estrutura

complexa adaptada à função da célula (FRESHOUR *et al.*, 1996; JARVIS; MACCANN, 2000; CARPITA; MACCANN, 2002; EVERT, 2006).

### 2.1.1 Parede celular primária

A parede primária é forte, flexível, com capacidade plástica e elástica, ao mesmo tempo em que é delgada e tem competência de acompanhar mudanças bruscas no tamanho celular, características estas requeridas para o crescimento e a divisão da célula (PILLING; HÖFTE, 2003; FRY, 2004). É composta principalmente por polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectinas), proteínas e compostos fenólicos. Entre as paredes primárias de células vizinhas encontra-se uma estrutura denominada lamela média (EVERT, 2006).

Os polissacarídeos são os componentes majoritários da parede celular. Eles interagem entre si e também com os outros componentes da parede celular (FRY, 1986). A celulose é um homopolissacarídeo linear composto por moléculas de glucose (Glc) ligadas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) as quais se associam por ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals* formando as microfibrilas (CARPITA, 2011). As hemiceluloses são os polissacarídeos que interagem com as microfibrilas de celulose e se caracterizam por apresentar ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre seus monossacarídeos (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico (MOHNEN, 2008). A parede celular é estruturada por inúmeras microfibrilas de celulose que interagem com as hemiceluloses, embebidas em uma matriz de polissacarídeos pécticos (FIGURA 1). Entre os polissacarídeos da matriz, as pectinas são solubilizadas por tampões aquosos, soluções ácidas diluídas ou quelantes de cálcio (CARPITA; MACCANN, 2002), enquanto as hemiceluloses requerem soluções alcalinas fortes para solubilização (PAULY *et al.*, 1999).

Os polissacarídeos pécticos (grego '*pektikos*', que significa congelar, solidificar ou coalhar (YAPO, 2011)) compreendem uma família de polímeros ácidos que incluem as homogalacturonanas, xilogalacturonanas e ramnogalacturonanas (RGI e RGII) (VORAGEN *et al.*, 2009).

Estruturalmente, as pectinas provavelmente sejam os polímeros mais complexos encontrados em organismos vivos, formando gel hidratado que regula a porosidade, integridade, força e ambiente iônico na parede celular (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; VORAGEN *et al.*, 2009; WOLF; GREINER, 2012).

As homogalacturonanas consistem de cadeias lineares de unidades de ácido D-galacturônico ligados  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), as quais podem estar metil-esterificadas em C-6. A ramnogalacturonana I (RGI) apresenta uma cadeia principal de unidades repetitivas  $[\rightarrow\alpha\text{-D-GalpA-1,2-}\alpha\text{-L-Rhap-1,4}\rightarrow]_n$ , sendo que, aproximadamente metade das unidades de ramnose (Rha) são substituídas no carbono 4 principalmente por arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas (MCNEIL; DARVILL; ALBERSHEIM, 1982; FINCHER; STONE, 1983; MOHNEN, 2008). Nas xilogalacturonanas e RG-II a cadeia principal é composta de homogalacturonana contendo diferentes substituintes. As xilogalacturonanas são substituídas na posição 3 da cadeia principal por  $\beta$ -D-xilose, enquanto RGII é o menor componente péctico, apresentando grande complexidade estrutural, com um total de 28-36 unidades e onze diferentes tipos de monossacarídeos (YAPO, 2011).

As hemiceluloses são um grupo heterogêneo de polissacarídeos. Este grupo inclui as xiloglucanas, glucuronoarabinoxilanas, mananas, galactomananas, glucomananas, glucuronoxilanas, galactoglucomananas e arabinoxilanas (CARPITA; MACCANN, 2002; LEROUXEL *et al.*, 2006; SCHELLER; ULVSKOV, 2010; KIM; DANIEL, 2012b).

As xiloglucanas são as principais hemiceluloses na parede primária de plantas superiores (BAUER *et al.*, 1973) e consistem de uma cadeia principal celulósica  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), substituída por D-xilose na posição 6 a cada três unidades consecutivas de Glc. As unidades de xilose (Xyl) podem estar substituídas por  $\beta$ -D-galactose (Gal) e estas por sua vez podem ser substituídas por  $\alpha$ -L-fucose.

A segunda hemicelulose mais importante é a glucuronoarabinoxilana, uma xilana com cerca de 25% de substituição por arabinose (Ara), ácido glucurônico, ou ácido 4-metil-glucurônico (DARVILL *et al.*, 1980; AWANO *et al.*, 2000). Tal polissacarídeo está presente, principalmente, na parede celular das monocotiledôneas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).



Mananas e galactomananas são hemiceluloses com estruturas formadas somente por manose (Man) na cadeia principal. Por outro lado, glucomananas ou galactoglucomananas são formadas por Man e Glc intercaladas em um padrão não repetitivo (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Alguns modelos foram propostos para parede primária das plantas superiores (Angiospermas) (KEEGSTRA *et al.*, 1973; TALMADGE *et al.*, 1973), entre estes, o mais aceito foi proposto por Carpita e Gibeaut (1993) (FIGURA 1). Eles propuseram dois tipos de parede primária com base nas diferenças na quantidade de polissacarídeos pécticos e tipo de hemicelulose principal. De acordo com este modelo, a parede celular é dividida em dois tipos: I e II. A parede primária do tipo I inclui as espécies de eudicotiledôneas em geral e algumas monocotiledôneas (não comelinóides). Por outro lado, a parede celular do tipo II, abarca as espécies das Poaceae e engloba a maior parte das monocotiledôneas (comelinóides). Recentemente, foi proposto um novo modelo de parede primária chamada tipo III o qual possui grande quantidade de mananas e é típica de pteridófitas e lycopodiófitas (SILVA *et al.*, 2011).

A parede primária do tipo I é composta por duas redes independentes, mas que se interagem. A rede celulose-xiloglucana, compreendendo 50% da parede celular, é embebida em uma matriz péctica de polissacarídeos (20-35%) (MCNEIL *et al.*, 1975; CARPITA; GIBEAUT, 1993). Além disso, a parede celular do tipo I contém outros polissacarídeos hemicelulósicos em menor proporção e grande quantidade de proteínas estruturais, as quais podem interagir com os polissacarídeos (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Na parede primária do tipo II as microfibrilas de celulose estão interligadas a hemicelulose principal, a glucuronoarabinoxilana. Em geral, possui menor proporção de pectina (10%), porém apresenta aumento da densidade de carga proveniente das unidades de ácido glucurônico das glucuronoarabinoxilanas (REIS; VIAN; ROLAND, 1994; CEUSTERS *et al.*, 2008). A quantidade de proteínas estruturais é menor, no entanto os compostos fenólicos participam na formação de ligações cruzadas entre os polissacarídeos (CARPITA; MACCANN, 2002; POPPER, 2005).

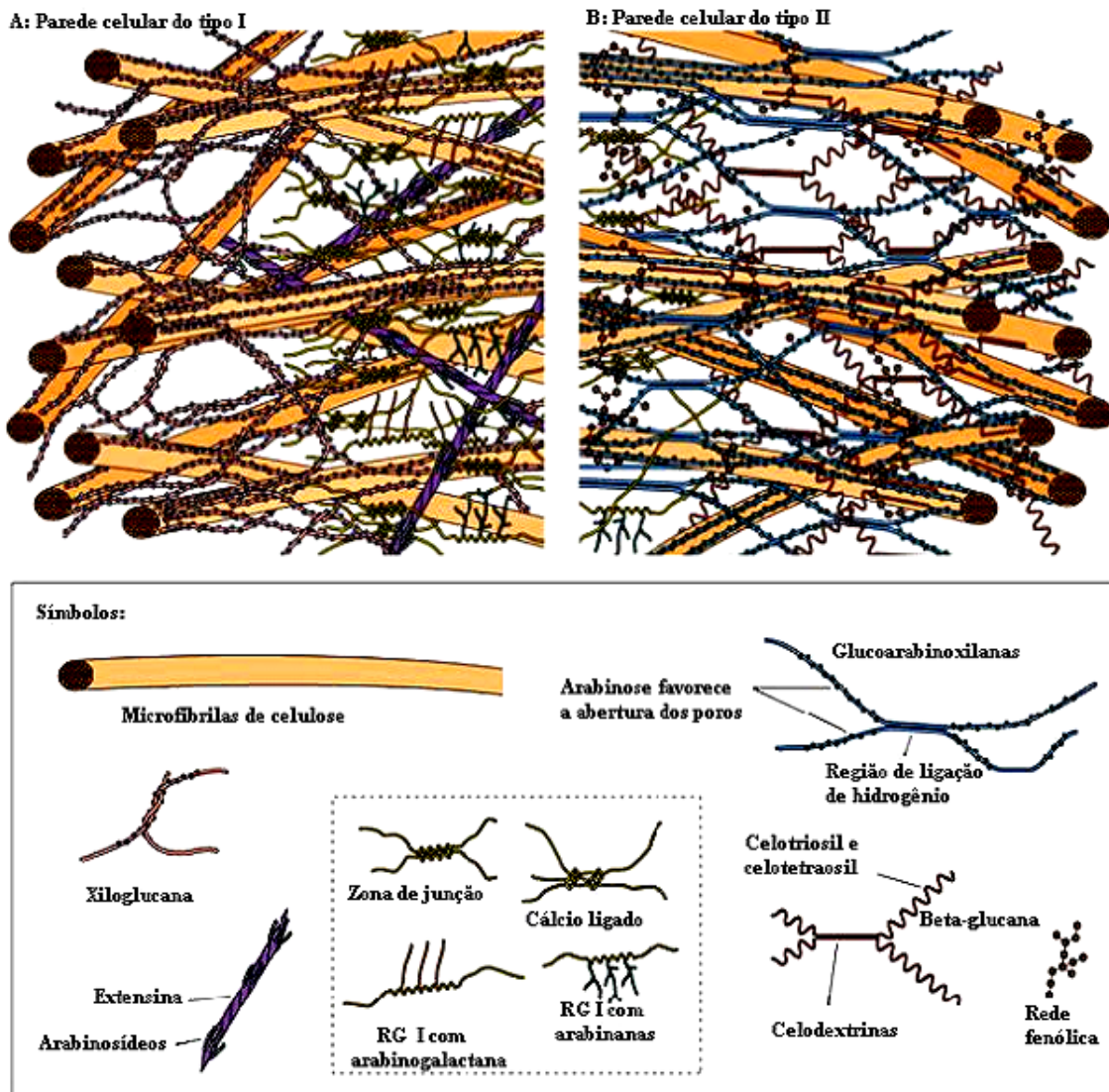


FIGURA 1- MODELOS DE ESTRUTURAS DA PAREDE PRIMÁRIA (ADAPTADO DE BUCHANAN *et al.*, 2000).

### 2.1.2 Parede celular secundária

A parede secundária é mais espessa (1 a 5  $\mu\text{m}$ ), rígida, contém maiores proporções de celulose e hemicelulose e quantidades desprezíveis de proteínas e pectinas comparadas à parede primária (BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992; ZHONG; YE, 2009). As principais hemiceluloses em eudicotiledôneas são glucuronoxilanas e glucomananas (ALBERSHEIM *et al.*, 2010).

Uma característica típica da parede secundária é a presença de lignina, o que interrompe o crescimento celular, resultando na diferenciação terminal da célula conferindo maior resistência à compressão e rigidez (TAIZ; ZEIGER, 2006; LI; WENG; CHAPPLE, 2008).

Alguns modelos de organização da parede celular secundária foram discutidos (REIS, 2004). Em geral, a parede secundária pode ser dividida em três camadas distintas, chamadas S1, S2 e S3 (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000) apresentando diferenças de espessura e de orientação das microfibrilas de celulose (FIGURA 2) (BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992).

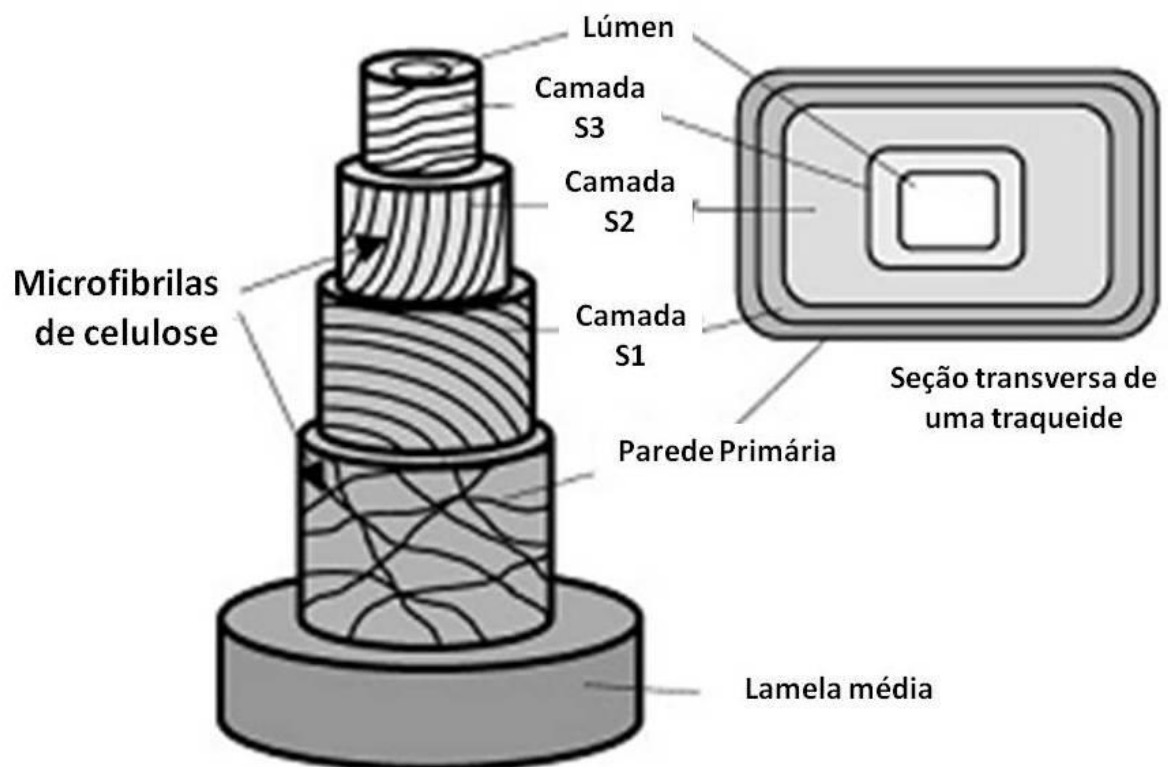


FIGURA 2- ESTRUTURA DAS PAREDES PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS (ADAPTADA DE PLOMION, LEPROVOST E STOKES (2001))

A lignina é o polímero típico da parede secundária (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Seus principais monômeros são os fenilpropenoides (ou monolignóis): coniferil, cumaril e sinapil FIGURA 3 (LI; WENG; CHAPPLE, 2008; LIMA, 2009). O conteúdo de lignina, assim como de seus monômeros, difere entre *taxa*, tecidos, tipos celulares e camadas da parede celular,

dependendo do estágio de desenvolvimento da planta e das condições ambientais (MELLEROWICZ *et al.*, 2001; BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

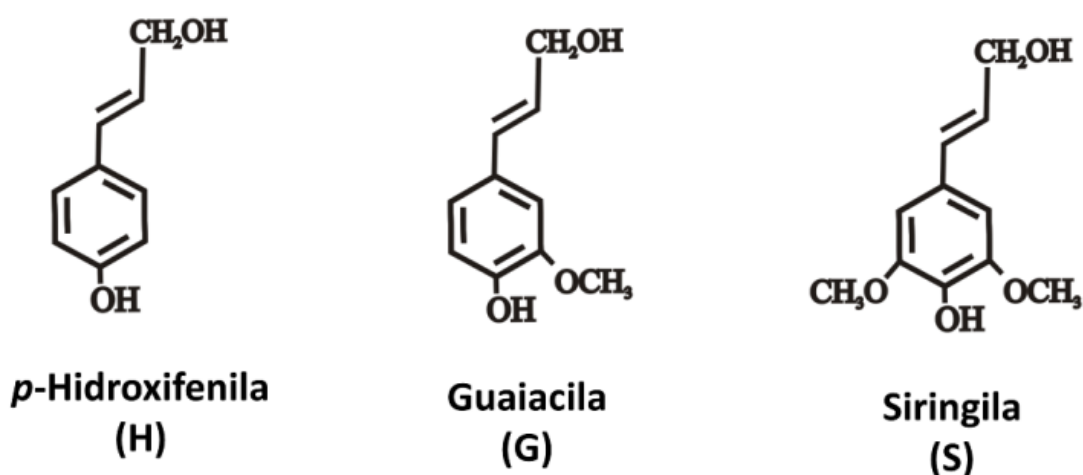


FIGURA 3- PRINCIPAIS MONOMEROS QUE COMPÕEM A LIGNINA  
FONTE: (LIMA, 2009)

## 2.2 ESTRESSES ABIÓTICOS

Os estresses abióticos são caracterizados por modificações nas condições físicas ou químicas no ambiente provocando alterações nos organismos vivos (MITTLER, 2006; ROY; TUCKER; TESTER, 2011). Os estresses abióticos vegetais são caracterizados por alterações nas condições ambientais necessárias para o crescimento e desenvolvimento vegetal, como quantidade de água, luz, temperatura e/ou alterações da composição química do solo (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2006). Desse modo, o estresse abiótico conduz a uma série de mudanças moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas que causam impactos negativos no crescimento e na produtividade das plantas (WANG; VINO CUR; ALTMAN, 2003; VINO CUR; ALTMAN, 2005).

A tolerância ao estresse refere-se à aptidão da planta para enfrentar o ambiente desfavorável e pode aumentar à medida que a planta é exposta a tal

meio, tais plantas são ditas aclimatadas (TAIZ; ZEIGER, 2006; TARDIEU; TUBEROSA, 2010). Por outro lado, a adaptação está relacionada à resistência adquirida por um processo evolutivo de seleção através de inúmeras gerações. Contudo, algumas vezes o termo adaptação é erroneamente usado como aclimação (TAIZ; ZEIGER, 2006; JANZ *et al.*, 2010).

A resposta das plantas ao estresse depende da duração, severidade e da taxa com que o estresse é imposto. Além disto, efeitos de estresses simultâneos causam respostas diferentes daquela promovida por um determinado estresse isolado. No campo, mais de um tipo de estresse abiótico pode estar influenciando as plantas e isto pode causar maior impacto sobre as elas (MITTLER, 2006).

Algumas respostas claramente permitem a planta se aclimatar ao estresse, enquanto o papel funcional de outras não é tão aparente. Compreender as respostas moleculares das plantas aos estresses abióticos e identificar os mecanismos que promovem a manutenção do crescimento e do desenvolvimento durante esse processo é de extrema importância (MORGAN, 1984; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2006). Dentre os principais estresses abióticos vegetais destacam-se o hídrico, o salino e o térmico.

### 2.2.1 Estresses Hídrico, Salino e Térmico

O estresse hídrico é caracterizado pelo excesso ou ausência de água necessária para o crescimento e desenvolvimento vegetal (KALLIS, 2008). A principal causa do estresse hídrico é a ausência de chuvas por um longo período. Esse estresse, principalmente nos trópicos, é agravado pela alta irradiação solar e por altas ou baixas temperaturas (CARAMORI; CARAMORI; MANETTI-FILHO, 2002; DAMATTA *et al.*, 2003). O excesso de sal no solo provoca o estresse salino (YADAV *et al.*, 2011). A salinização em terras agriculturáveis causa grandes perdas econômicas. A principal causa é a irrigação artificial com águas salinas. Dados recentes indicam que, anualmente, perdas devido à salinização poderiam alcançar U\$11,4 bilhões em terras

irrigadas e U\$1,2 bilhões em áreas não irrigadas (YADAV *et al.*, 2011). O estresse térmico é caracterizado por temperaturas mais baixas ou elevadas do que a planta necessita (KOTAK *et al.*, 2007).

Os mecanismos de resposta ao estresse hídrico podem ser agrupados em duas categorias gerais: mecanismos para evitar o estresse, por exemplo, crescimento profundo das raízes em plantas para absorver águas em ambiente com pouca chuva; e mecanismos de tolerância ao estresse, por exemplo, plantas xerófitas que possuem adaptações morfológicas que evitam os efeitos do ambiente quente e seco (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Os estresses hídrico e salino provocam estresse osmótico, promovendo frequentemente o aumento de metabólitos osmorreguladores citoplasmáticos tais como prolina,  $\beta$ -alanina e glicina betaína, além dos carboidratos de baixa massa (JANG; SHEEN, 1994; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; IBRAHEEM *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011). Tais variações de osmorreguladores podem ser uma forma da planta se aclimatar às condições hídricas desfavoráveis do solo (KEREPESI; GALIBA, 2000; LAWLOR; CORNIC, 2002; SANTOS, 2008b; SANTOS, 2009). Monossacarídeos como a Glc e a frutose podem ser liberadas dos seus respectivos polímeros (amido e frutanas) em resposta ao estresse. Cessado o estresse, estes podem ser repolimerizados facilitando o rápido ajustamento do potencial hídrico (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

Os oligossacarídeos também podem atuar nestas respostas como osmorreguladores, tais como os oligossacarídeos da família da rafinose (RFO – *Raffinose Family Oligosaccharides*) (BACHMANN; MATILE; KELLER, 1994; TAJI, 2004). Muitos autores (SARAVITZ; PHARR; CARTER-JR., 1987; KUO; VANMIDDLESWORTH; WOLF, 1988; LOWELL; KUO, 1989) sugerem que os RFO, principalmente rafinose e estaquiose, estão relacionados com o processo de tolerância, promovendo a formação de um estado vítreo que protege as macromoléculas (LEOPOLD; SUN; BERNAL-LUGO, 1994; SPRENGER; KELLER, 2000; PENNYCOOKE; JONES; STUSHNOFF, 2003; MOORE, 2006; MOORE *et al.*, 2007; SANTOS, 2008b). Castillo *et al.* (1990), sugeriram que RFO podem, também, fornecer um microambiente de água e de grupos hidroxílicos ligados protegendo proteínas de membrana e outras moléculas biologicamente ativas da desnaturação durante o processo de dessecação das

sementes. Contudo, o papel primário destes oligossacarídeos nos vegetais é o de servir como carboidratos de reserva e para transporte no floema (AYRE, 2003).

Inúmeros estudos conduzidos por diferentes autores demonstraram que a salinidade diminui a capacidade fotossintética (ASHRAF; KHANUM, 1997; FISARAKIS; CHARTZOULAKIS; STAVRAKAS, 2001; ROMERO-ARANDA; SORIA; CUARTERO, 2001), a difusão de CO<sub>2</sub> (FLEXAS *et al.*, 2004) e a produção de pigmentos fotossintéticos as plantas (YADAV *et al.*, 2011). Como em plantas expostas a estresses osmóticos há uma demanda extra de ATP necessário necessária para acumulação de osmólitos orgânicos ou íons (MUNNS, 2002), plantas tolerantes ou aclimatadas possuem mudanças fisiológicas que garantem a produção aumentada de energia e metabólitos reguladores.

As plantas adaptadas ao ambiente salino são caracterizadas como plantas halófitas. Um dos mecanismos das plantas halófitas para evitar o estresse e manter o crescimento vegetal é armazenar o excesso de sal em vacúolos (YADAV *et al.*, 2011). Os efeitos do estresse salino podem ser divididos em três amplas categorias: (i) redução do potencial osmótico do solo, reduzindo a disponibilidade de água, (ii) deterioração da estrutura física do solo tais como a permeabilidade de água e diminuição da aeração e (YE *et al.*) aumento da concentração de íons que tem efeitos inibitórios no metabolismo da planta (toxicidade e deficiência em absorção da alguns nutrientes minerais). Se uma quantidade de sal entra no fluxo de transpiração da planta haverá injúria nas células de transpiração da folha e podendo causar grandes reduções no crescimento vegetal. Este efeito é denominado específico do sal ou efeito do excesso de íons por salinidade (GREENWAY; MUNNS, 1980). O efeito inicial da salinidade, especialmente em baixas a moderadas concentrações, é devido aos seus efeitos osmóticos (MUNNS; TESTER, 2008). Em altas concentrações devido ao excesso de íons Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup> os danos típicos são queimas e necrose dos ápices das folhas (WAHOME; JESCH; GRITNER, 2001).

Certos grupos de plantas demonstram capacidade de sobreviver à extrema perda de água (menos que 5%) dos seus tecidos vegetativos, por prolongados períodos, sem sofrer danos permanentes. Desse modo, estas

plantas, ao contrário daquelas que são tolerantes ao estresse hídrico, são resistentes à dessecação. Devido à maneira pela qual elas podem reidratar seus órgãos vegetativos (raízes, folhas e algumas vezes flores) e retornar ao seu estado natural foi-lhe dado o nome de plantas ressurreição (*resurrection plants*). Elas são provindas das regiões secas da Ásia Central, América do Sul e, sobretudo da África do Sul (GAFF, 1971; MOORE, 2006).

Em se tratando do estresse térmico, globalmente, a frequência e a severidade das ondas de calor aumentaram nas últimas décadas e as temperaturas estão previstas aumentar ainda mais no futuro próximo (MATÉ; OOSTHYZEN, 2012). Em geral, elevação da temperatura em 10-15°C acima da temperatura ótima é considerada estresse térmico. No entanto, estresse térmico é uma complexa função da intensidade (temperatura em graus), duração e taxa de aumento de temperatura (WAHID *et al.*, 2007).

Alta temperatura pode causar perda da organização da grana dos tilacoides e desnaturação do fotossistema II e do complexo de coleta de luz II (DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2011). A desorganização da estrutura celular das folhas (DINAR; RUDICH; ZAMSKI, 1983) que são especialmente sensíveis ao estresse térmico (KRAUSE; SANTARIUS, 1975) causa consideráveis impactos na agricultura (ZHANG *et al.*, 2009a).

A tolerância das plantas ao estresse envolve a manutenção da homeostase celular, detoxificação de compostos nocivos e alterações no crescimento. Tais mecanismos são recrutados em função do tempo e da intensidade do estresse e podem se processar em variados níveis de complexidade: morfológicamente, através da redução da área foliar e do aumento do sistema radicular (volume e/ou profundidade); fisiologicamente, por meio de estratégias como: o fechamento estomático; ajuste osmótico, maior eficiência no uso da água; ativação do sistema antioxidante; absorção e fixação noturna de CO<sub>2</sub> (plantas CAM, *Crassulacean Acid Metabolism*); e, molecularmente: pela expressão diferencial de genes, tais como aqueles codificadores de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) e enzimas antioxidantes (função protetora); proteínas para formação de canais de água (aquaporinas); biossíntese de osmólitos compatíveis; e enzimas de remodelamento dos componentes da parede celular (extensibilidade e



crescimento celular), entre outros (PALMER; SOLTIS; CHASE, 2004; MITTLER, 2006; KOSOVÁ *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Respostas aos estresses abióticos relacionadas à parede celular

A parede celular está envolvida em respostas imediatas das plantas aos estresses ambientais, mediando a interação entre as células e seu ambiente (PENNELL, 1998; VORWERK; SOMERVILLE; SOMERVILLE, 2004), incluindo estresses tais como lesões (CARDEMIL; RIQUELME, 1991), osmótico (WAKABAYASHI; HOSON; KAMISAKA, 1997), hídrico (ZWIAZEK, 1991), térmico (WEISER; WALLNER; WADDELL, 1990; YANG *et al.*, 2006; JAIN *et al.*, 2010; HOLLAND *et al.*, 2012) e salino (NEUMANN; VOLKENBURGH; CLELAND, 1988; MUSTARD; RENAULT, 2004; PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2010). Na tolerância vegetal, o ajustamento da parede celular em condições de estresse abiótico é um fenômeno importante (HAMANN, 2012). Os mecanismos, no entanto, parecem ser complexos e variar entre espécies e órgãos (SASIDHARAN; VOESENEK; PIERIK, 2011). Muitas das pesquisas têm focado na relação biofísica entre a extensibilidade e o potencial hídrico, enquanto pouca atenção tem sido dada para as mudanças na composição da parede celular de plantas que sofreram estresse (MOORE *et al.*, 2008).

Mudanças na composição da parede celular decorrentes do estresse hídrico foram descritas por alguns autores (SAKURAI; TANAKA; KURAIISHI, 1987a; WU *et al.*, 1996; PIRO *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2010). Há um modelo proposto por Moore (2008) em que a redução de água reduz as interações por ligações de hidrogênio com o meio aquoso e amplia as interações entre os polissacarídeos, alterando as propriedades biofísicas da parede celular e diminuindo o crescimento vegetal (FIGURA 4).

Outras propostas foram apresentadas em parede celular de milho (*Z. mays*). As paredes celulares dos tecidos não essenciais ao crescimento imediato são enrijecidas, enquanto as paredes celulares daqueles tecidos com função primária no crescimento são afrouxadas (HOSON, 1998; FAN, 2006). Estas respostas diferenciadas permitem que tecidos importantes, como o do

ápice, continuam a crescer mesmo em baixa pressão de turgor (WU *et al.*, 1994; WU *et al.*, 1996; WU; COSGROVE, 2000), enquanto os tecidos que cessaram o crescimento aumentam o enrijecimento da parede celular como uma resposta protetora ao estresse (FAN, 2004). Desse modo, a manutenção do crescimento das raízes é favorecida, enquanto regiões que cessaram o crescimento são protegidas. Foi verificado que houve afrouxamento da parede celular de folhas de milho (*Z. mays*) (ACEVEDO; HSIAO; HENDERSON, 1971) e de uva (SWEET *et al.*, 1990) em condições de estresse hídrico. Assim, as respostas ao estresse relacionadas a parede celular podem variar entre diferentes espécies e órgãos vegetais.

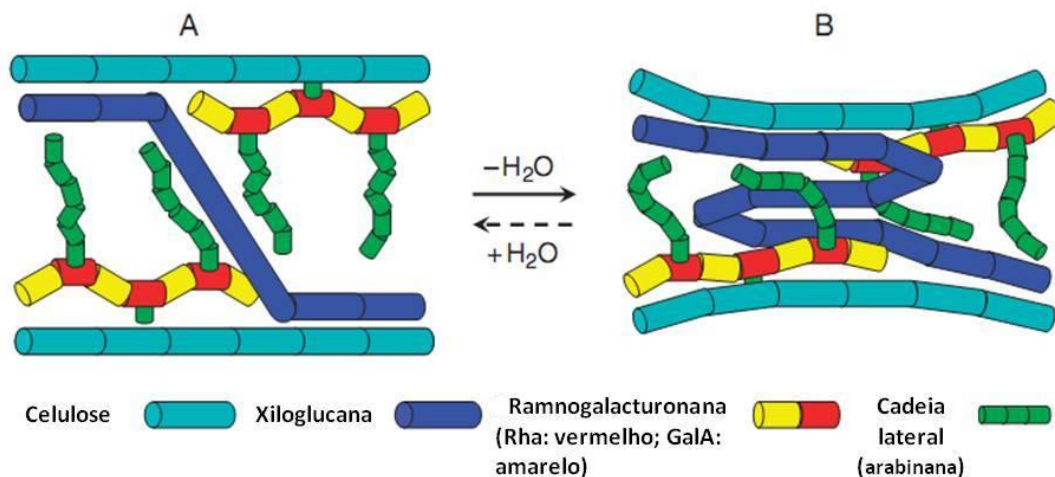


FIGURA 4- MODELO REPRESENTANDO OS EFEITOS DA PERDA DE ÁGUA NA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR (ADAPTADO DE MOORE *et al.* (2008)).

Os efeitos físicos na parede celular provocam alterações na solubilidade dos polissacarídeos com os diferentes solventes. O enrijecimento aumenta as associações entre os polímeros dificultando sua solubilização, enquanto o afrouxamento apresenta efeito oposto (FRY, 1980; VINCKEN *et al.*, 1995; KONNO *et al.*, 2008; LEUCCI *et al.*, 2008). Em condições de estresse hídrico o conteúdo total de polissacarídeos extraídos do hipocótilo de abóbora (*Cucurbita maxim*) foi reduzido (SAKURAI; TANAKA; KURAIISHI, 1987a; b).

A parede celular de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) adaptadas ao estresse osmótico continha alta proporção de proteínas e de

hemiceluloses e diminuição do conteúdo de celulose, além de apresentarem grandes mudanças na organização das pectinas, comparado à parede celular de células não adaptadas ao estresse hídrico e salino (IRAKI *et al.*, 1989a). Iraki *et al.* (1989b) verificaram redução da força tensil da parede celular associada com substancial redução da rede de celulose. Portanto, a diminuição da expansão celular por estresse osmótico deve estar mais ligada a mudanças na composição química da parede celular do que a aspectos mecânicos.

Em cultura de células de tabaco (*N. tabacum*) (MCCANN *et al.*, 1994), raízes de plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*) (ZHONG; LÄUCHLI, 1993) e milho (*Z. mays*) (WU *et al.*, 1994) submetidas a estresse salino e hídrico foi verificado maior solubilidade das pectinas (WU *et al.*, 1996). O mesmo foi verificado no tratamento com alumínio em raízes de milho (*Z. mays*) (SCHMOHL; HORST, 2000) e de arroz (*O. sativa*) (YANG *et al.*, 2007).

Cultura de células tabaco (*N. tabacum*) (IRAKI *et al.*, 1989b) e raízes de trigo (*Triticum durum*) (LEUCCI *et al.*, 2008), ambas tolerantes ao estresse hídrico, apresentaram aumento do conteúdo de ácidos urônicos nas frações pécticas da extraídas da parede celular comparado com o conteúdo extraído daquelas não tolerantes. Adicionalmente, células de cultura de tabaco (*N. tabacum*) não tolerantes ao estresse hídrico demonstraram secreção de maior quantidade de polissacarídeos ácidos comparado às culturas tolerantes (IRAKI; BRESSAN; CARPITA, 1989). Desse modo, os grupos ácidos das pectinas têm importante papel na manutenção da tolerância ao estresse hídrico.

O aumento da incorporação de polissacarídeos pécticos na parede celular confere aumento na hidratação no estresse hídrico (BOFFEY; NORTHCOTE, 1975; PIRO *et al.*, 2003). Cadeias laterais de arabinanas, galactanas e arabinogalactanas, entre outras funções, estão envolvidas na determinação do nível de hidratação da matriz da parede celular e habilidade de formar géis (WILLATS *et al.*, 2001). Em plantas resistentes a dessecação foi observado maior conteúdo de Ara quando comparado a outras eudicotiledôneas (MOORE *et al.*, 2008). Arabinanas mantém a flexibilidade de células guarda (JONES, 2003) diminuindo a forte interação entre as cadeias pécticas de homogalacturonanas. O aumento de pectinas no estresse salino foi relacionado ao aumento de galacturonanas, destacando-se principalmente ramnogalacturonanas (IRAKI *et al.*, 1989b).

O aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) pode favorecer ligações entre os componentes da parede celular, enrijecendo-a (RALPH *et al.*, 1994; O'BRIEN *et al.*, 2012). Por outro lado, as ROS podem, também, causar degradação na parede celular (SHOPFER, 2001).

Estresses abióticos também alteraram a composição de hemiceluloses extraídas da parede celular. O estresse hídrico aumentou o conteúdo de hemiceluloses extraídas da parede celular de células de tabaco (*N. tabacum*) (IRAKI; BRESSAN; CARPITA, 1989) e diminuiu a sua secreção no meio de cultura (TERRY; JONES; IRAKI; BRESSAN; CARPITA, 1989). Leucci *et al.* (2008) observaram redução da solubilidade de hemiceluloses em raízes de trigo (*Triticum aestivum*) tolerante ao estresse hídrico quando submetidas a este tipo de estresse. Konno *et al.* (2008) verificaram maior aumento no conteúdo de Ara nas frações hemicelulósicas ao longo do desenvolvimento no cultivar de trigo (*T. aestivum*) tolerante ao estresse hídrico comparado ao cultivar sensível ao estresse hídrico. No estresse salino também foi verificado aumento do conteúdo de hemiceluloses em corniso (*Cornus stolonifera*) (MUSTARD; RENAULT, 2004). O aumento nas concentrações de hemicelulose poderia contribuir para tornar a rede celulose-hemicelulose mais rígida, diminuindo a capacidade de expandir da parede celular, desse modo contribuindo para a decréscimo do crescimento.

Xiloglucanas endotransglicosilases estão envolvidas na reestruturação e na deposição da parede secundária em raízes, caule e folhas de álamo (*Populus tremula*) (BOURQUIN *et al.*, 2002), indicando seu papel no enrijecimento da parede celular em adição a expansão celular, criando conexões entre a parede primária e a secundária (YANG *et al.*, 2006). O controle da clivagem enzimática dos polímeros de xiloglucanas constitui um controle direto da taxa de expansão celular. A expressão aumentada da xiloglucana endotransglicosilase causou maior resistência ao estresse hídrico e salino em *Arabidopsis thaliana* (CHO *et al.*, 2006), talvez por aumentar as ligações entre as xiloglucanas aumentando o enrijecimento da parede celular. Por outro lado, plantas de *A. thaliana* com deficiência de xiloglucanas apresentaram paredes celulares mais fracas (CAVALIER *et al.*, 2008).

A adaptação a condições de estresse hídrico em células de tabaco (*N. tabacum*) em cultura (IRAKI *et al.*, 1989a) e condições de estresse salino em

raízes de algodão (*Gossypium hirsutum*) (ZHONG; LÄUCHLI, 1998) resultou em redução no conteúdo de celulose. No entanto, a redução substancial do conteúdo de celulose da parede celular inferiu aumento direto no conteúdo de hemiceluloses em cultura de células de tabaco (*N. tabacum*) (IRAKI; BRESSAN; CARPITA, 1989). Adicionalmente, cultura de células de tomate (*Lycopersicon esculentum*), tabaco (*N. tabacum*), cevada (*Hordeum bulbosum*) (SHEDLETZKY *et al.*, 1992) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (ENCINA *et al.*, 2001) com biossíntese de celulose inibida aumentaram as interações envolvendo pectinas na parede celular garantindo resistência similar a observada na presença da celulose.

A parede celular pode sofrer mudanças drásticas nas plantas resistentes a dessecação como as plantas ressurreição, destacando-se a dobradura na parede celular, que foi proposto ser uma estratégia desenvolvida pela célula para evitar a ruptura do plasmalema, desse modo, permitindo que a integridade da parede celular seja mantida (FARRANT, 2000; MOORE, 2006). Quando as plantas são reidratadas, as células retornam ao seu volume inicial sem aparente injúria. Tais dobras na parede celular também foram observadas em sementes secas e a maneira de cada parede celular se colapsar é característica de cada espécie (WEBB; ARNOTT, 1982). Este fenômeno foi, também, verificado na parede celular de briófitas quando dessecadas (PROCTOR, 2001; PROCTOR; LIGRONE; DUCKETT, 2007).

Para o café, uma planta cultivada que apresenta excepcional importância para economia agrícola do Brasil, a literatura a respeito das alterações dos polissacarídeos das folhas associadas a condições de estresse é praticamente inexistente.

### 2.3 GÊNERO *Coffea* (CAFÉ)

O café é uma planta perene, eudicotiledônea, pertencente ao gênero *Coffea* da família Rubiaceae (EIRA *et al.*, 2006) sendo descritas aproximadamente 100 espécies neste gênero (CARVALHO *et al.*, 1991). As duas principais espécies de maior comercialização mundial são: *Coffea arabica*

que compreende 70% do mercado, enquanto *Coffea canephora* que ocupa 30% (VIEIRA *et al.*, 2006). *C. arabica* e *C. canephora* são plantas de porte arbustivo ou arbóreo podendo atingir 4 m, com caule lenhoso, folhas persistentes e flores hermafroditas, apresentam altos níveis de autofecundação (LASCHERMES *et al.*, 1999).

A filotaxia da folha persistente é oposta decussada, onde duas folhas crescem em sentidos opostos, e apresentam 90° de rotação em relação ao ramo de crescimento. A lâmina foliar é oblonga-ovada com margem inteira, a base e o topo são acuminadas, com as nervuras medianas em direção a margem (CARVALHO *et al.*, 1991). Possui flores brancas aglomeradas e aromáticas ao longo dos ramos. A espécie é autocompatível, multiplicando-se predominantemente por autofecundação e de acordo com Laschermes *et al.* (1999) *C. arabica* é a única espécie tetraploide do gênero *Coffea* ( $2n=44$ ). É uma planta exigente em termos de cuidados na nutrição, clima e apresenta uma intolerância a altas temperaturas e ao frio (THOMAZIELLO *et al.*, 1995).

A cafeicultura tem sido por décadas uma das mais importantes atividades agrícolas no Brasil, colocando-o como maior produtor mundial e sendo responsável pela incorporação de novas fronteiras agrícolas. O café é a segunda *commodity* mais valorizada nos mercados internacionais, ficando atrás somente do petróleo (LEROY *et al.*, 2001).

A produção nacional para a safra do ano 2011 foi de 43,15 milhões de sacas de 60 Kg de café beneficiado, uma produção 10,5% menor que a do ano anterior (48,09 milhões de sacas). Um dos fatores que causou essa queda foi o ano de baixa bienalidade do café. Outros fatores foram impactantes como o estresse hídrico ou períodos de temperaturas extremas em alguns estados brasileiros. Estes fatores afetaram o potencial produtivo das lavouras nas principais regiões produtoras pelo desfolhamento e floradas irregulares e com intensidade variável (CONAB, 2011).

Uma parcela substancial da safra mundial é produzida por pequenos proprietários em regiões frequentemente sujeitas a períodos de estiagem, onde o emprego da irrigação é uma condição rara favorecendo condições de estresse hídrico (DAMATTA; RAMALHO, 2006). Em anos recentes, a cafeicultura brasileira sofreu um processo de expansão para regiões marginais, como o cerrado mineiro e o oeste baiano, antes consideradas pouco aptas ao

desenvolvimento da cultura (SANTOS, 2009). Paralelamente, surgiram novos desafios relativos à menor disponibilidade hídrica, em grande parte devido à má-distribuição das chuvas ao longo do ano, além de temperaturas mais elevadas, impondo grandes limitações climáticas à produção do café (SANTOS, 2009).

*Coffea arabica* é uma espécie nativa das florestas da Etiópia tropical a altitudes de 1600-2800 m. Nesta região, a temperatura possui pouca flutuação sazonal, com uma média anual de cerca de 20°C e as chuvas são bem distribuídas, variando de 1600 até mais de 2000 mm, com uma estação seca durando de três a quatro meses coincidindo com o período frio (DAMATTA; RAMALHO, 2006). Todos os cultivares de espécies de *C. arabica* crescidas no sul do Brasil tem baixa variabilidade para tolerância ao frio (DAMATTA; RAMALHO, 2006). *Coffea canephora*, por outro lado, é uma espécie nativa das terras baixas das florestas do rio Congo, que se estende pelo Lago Victoria em Uganda. A altitude desta região varia do nível do mar até 1200 m em Uganda. Nesta região, a temperatura média é entre 24-26°C, sem grandes oscilações, com abundante período de chuva de 9 a 10 meses, com precipitação superior a 2000 mm e a umidade atmosférica aproxima-se da saturação (DAMATTA; RAMALHO, 2006).

O preço internacional do café é fortemente afetado por eventos de secas e geadas (DAMATTA; RAMALHO, 2006). As folhas de café são perenes e sua produção é dependente da temperatura e da disponibilidade de água. No entanto, as folhas caem quando as plantas passam por períodos de seca (DRINNAN; MENZEL, 1995). Tanto altas como baixas temperaturas provocam alterações na taxa fotossintética além de influenciar na queda das folhas (CARR, 2001). Adicionalmente, estresse hídrico provoca efeitos negativos no café como redução do comprimento do caule, do número de nós e da área individual das folhas (MAZZAFERA; CARVALHO, 1987).

Lima *et al.* (2002) sugeriram que o acúmulo de prolina verificado em plantas de *C. arabica* submetidas a estresse hídrico poderia estar mais relacionado com as injúrias impostas pela limitação hídrica do que com um possível mecanismo de defesa contra o estresse por seca.

O Projeto Genoma do Café (<http://www.lge.unicamp.br/cafe/>) identificou um conjunto de 200.000 sequências expressas em diversos tecidos, em

diferentes etapas do desenvolvimento e condições ambientais diversas. Um dos resultados deste projeto foi descrito por SANTOS (2008a), identificando respostas ao estresse em folhas de café submetidas a estresses abióticos avaliando a expressão do gene *galactinol sintase*.

Aparentemente, o maior componente de adaptação diferencial à seca entre os cafés arábicos e robustos (*Canephora*) parece ser comportamental, relacionado às taxas de uso da água ou eficiência na extração de água do solo. No entanto, estudos recentes têm investigado a participação do sistema antioxidante em cafeeiros e sua possível correlação com tolerância à seca. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase) foi correlacionado com a tolerância a seca em café robusta (*C. canephora*) (DAMATTA *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2007). Adicionalmente, *C. canephora* submetida a estresse hídrico apresentou acumulação da subunidade menor da rubisco, acreditado ser um fator contribuinte para aumentar a função antioxidante da fotorrespiração nestas plantas estressadas (MARRACCINI *et al.*, 2011).

Após extensa revisão bibliográfica, não foi encontrado na literatura informações sobre os efeitos dos estresses abióticos na parede celular das folhas de *C. arabica* e *C. canephora*. Portanto, o intuito deste trabalho foi investigar estes efeitos dos estresses abióticos nas paredes celulares de *C. arabica* e *C. canephora* e pontuar características na parede celular do clone tolerante de *C. canephora* (clone 14) ao estresse hídrico que o diferencie do clone sensível (109A).



### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral: avaliar os efeitos de estresses abióticos nos componentes da parede celular e na estrutura celular das folhas de café.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a extratibilidade dos polissacarídeos da parede celular de folhas de *C. arabica* submetidas a condições de estresse térmico, hídrico e salino e de *C. canephora* (Clone 14 e 109A) submetidas ao estresse hídrico;
- ✓ Analisar a composição monossacarídica das frações solubilizadas da parede celular de folhas de *C. arabica* e *C. canephora* (Clone 14 e 109A) submetidas a condições de estresse térmico, hídrico e salino;
- ✓ Avaliar a distribuição de massa molecular das frações solúveis isoladas da parede celular de folhas de *C. arabica* e *C. canephora* (Clone 14 e 109A) submetidas a condições de estresse térmico, hídrico e salino;
- ✓ Analisar as frações polissacarídicas de interesse por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear;
- ✓ Caracterizar as alterações nas estruturas celulares das células do mesofilo de folhas de *C. arabica* e *C. canephora* (Clone 14 e 109A) submetidas a condições de estresse térmico, hídrico e salino;
- ✓ Quantificar os monolignóis na fração lignocelulósica proveniente de folhas de *C. arabica* submetidas ao estresse térmico, hídrico e salino;
- ✓ Quantificar os carboidratos de baixa massa isolados das folhas de *C. canephora* (Clone 14 e 109A) submetidas ao estresse hídrico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DAS PLANTAS SUBMETIDAS AOS ESTRESSES ABIÓTICOS

#### 4.1.1 Estresse hídrico

O estresse hídrico foi conduzido em casa de vegetação no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR). Foram utilizadas cinco plantas de *C. arabica* cv. IAPAR-59 com a mesma idade e tamanho similar (um ano e oito meses e cerca de 70 centímetros de altura) e *C. canephora* clones 109A e 14, sendo submetidas a um período sem adição de água em vasos com aproximadamente 25 Kg de substrato (3 terra: 1 areia: 1 composto orgânico). Todos os vasos foram expostos em posições semelhantes em relação à incidência da luz solar. As coletas dos materiais para análise foram realizadas conforme as leituras do potencial hídrico, sendo subdivididas em: controle (-1,34 MPa), estresse moderado (-2,39 MPa), estresse severo (-4,5 MPa) e recuperado (material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo). Para cada nível de tratamento foram feitas coletas das folhas (*pools* de folhas de cinco vasos de plantas submetidas às mesmas condições). As folhas coletadas foram trituradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até o momento de análise.

O potencial de água na folha foi monitorado através de psicrômetros de termopar (modelo C-30, Wescor, Inc., Logan, Ut) acoplados a um datalogger (Campbell Scientific, Inc., Logan, Ut, modelo CR-7). A cada dia de leitura, entre 9h30min e 10h, uma amostra de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> da folha coletada da parte mediana de ramo plagiotrópico posicionado no meio da planta (folha totalmente madura e sem sinais danos ou deficiências), de cada planta foi

coletada e colocada nos psicrômetros. O *datalogger* foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até o equilíbrio da pressão de vapor na câmara. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio. Após a obtenção do potencial total da água ( $\Psi_t$ ), os sensores foram imersos durante 4 min em nitrogênio líquido e as leituras retomadas para obtenção do potencial osmótico ( $\Psi_s$ ). O cálculo do potencial de pressão foi realizado através de  $\Psi_t - \Psi_s$ . A coleta das plantas para a realização dos *pools* foi baseada no potencial hídrico em função dos níveis de estresse estabelecidos, realizado através do monitoramento do potencial hídrico de cada planta por psicrometria.

#### 4.1.2 Estresse térmico

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

Primeiramente, as plantas foram aclimatadas na câmara durante sete dias em uma temperatura de 24°C e fotoperíodo controlado. Após esse período, foi iniciado o tratamento com a elevação da temperatura para 37°C durante cinco dias com manutenção de irrigação diária. Foram estipulados três períodos de coleta para o experimento de estresse térmico: Dia 0 - folhas coletadas um dia antes do início do tratamento em plantas mantidas a 24°C, Dia 3 e Dia 5 – folhas coletadas três e cinco dias após o início do tratamento térmico, respectivamente. As folhas foram coletadas no mesmo estágio de desenvolvimento (segundo par de folhas de cada ramo plagiotrópico) e imediatamente trituradas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C. A cada coleta foi feito um *pool* de folhas (mistura de folhas dos cinco vasos do

experimento, de plantas submetidas as mesmas condições de estresse). Foram realizadas medições das trocas gasosas nas plantas através do (Li6200-Licor) para obter os valores da taxa fotossintética após o início do estresse térmico.

#### 4.1.3 Estresse salino

O estresse salino foi conduzido em casa de vegetação no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Foram selecionadas vinte plantas de *C. arabica* cv. IAPAR-59, com idade aproximada de seis meses, todas cultivadas em vasos contendo 1,5 Kg de substrato. Para evitar o estresse bruto, as plantas foram irrigadas no primeiro dia com 50 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl e no segundo dia 100 mmol.L<sup>-1</sup>. A partir do terceiro dia até o final do experimento as plantas foram irrigadas diariamente com 150 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl. Folhas do mesmo par foram coletadas de cada planta antes de iniciar o tratamento (controle - dia 0) e 3, 6, 12 e 25 dias após o início do tratamento com 150 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl. Após a coleta as folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C.

#### 4.2 MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA

Para a microscopia eletrônica as folhas coletadas foram fixadas em Karnovsky (sem cloreto de cálcio e com 2,5% de glutaraldeído) (KARNOVSKY, 1965), lavados em 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de tampão de ácido cacodílico (pH 7,2) e fixado em 2% OsO<sub>4</sub> em 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de tampão de ácido cacodílico (pH 7,3) por 1 h. Sequencialmente, as folhas foram desidratadas com etanol e acetona, embebidas em Epon 812 (LUFT, 1961), contrastada usando acetato de urânio com citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL-JEM 200 EX II em voltagem de aceleração 80 ou 100 kV (Peabody, MA).

Para a microscopia óptica, foi utilizado o mesmo fixador. As folhas foram emblocadas em glicol metacrilato (JB-4) e seccionadas em um micrótomo rotatório. Sessões transversas foram coradas com azul de toluidina 0,05% (m/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968), montadas em resina sintética (Entellan<sup>®</sup>) e observadas em microscópio óptico OLYMPUS BH-2.

### 4.3 EXTRAÇÕES DOS CARBOIDRATOS

#### 4.3.1 Carboidratos de baixa massa

As folhas de café (*C. arabica* e *C. canephora*) previamente trituradas foram liofilizadas. As folhas secas foram desclorofiladas com clorofórmio e os carboidratos de baixa massa foram extraídos com uma mistura metanol:água (7:3) durante 16h e em seguida filtrados em tecido sintético e secos em evaporador rotativo (ALBINI *et al.*, 1994). Os carboidratos de baixa massa foram ressolubilizados em água e lavados com acetato de etila por três vezes. A fração aquosa foi congelada e liofilizada. O material seco foi ressolubilizado em água, filtrado em filtro descartável de 0,22 µm e analisado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). As folhas desclorofiladas e livres de carboidratos de baixa massa foram utilizadas para a extração dos polissacarídeos da parede celular conforme o fluxograma de trabalho que está indicado na FIGURA 5.

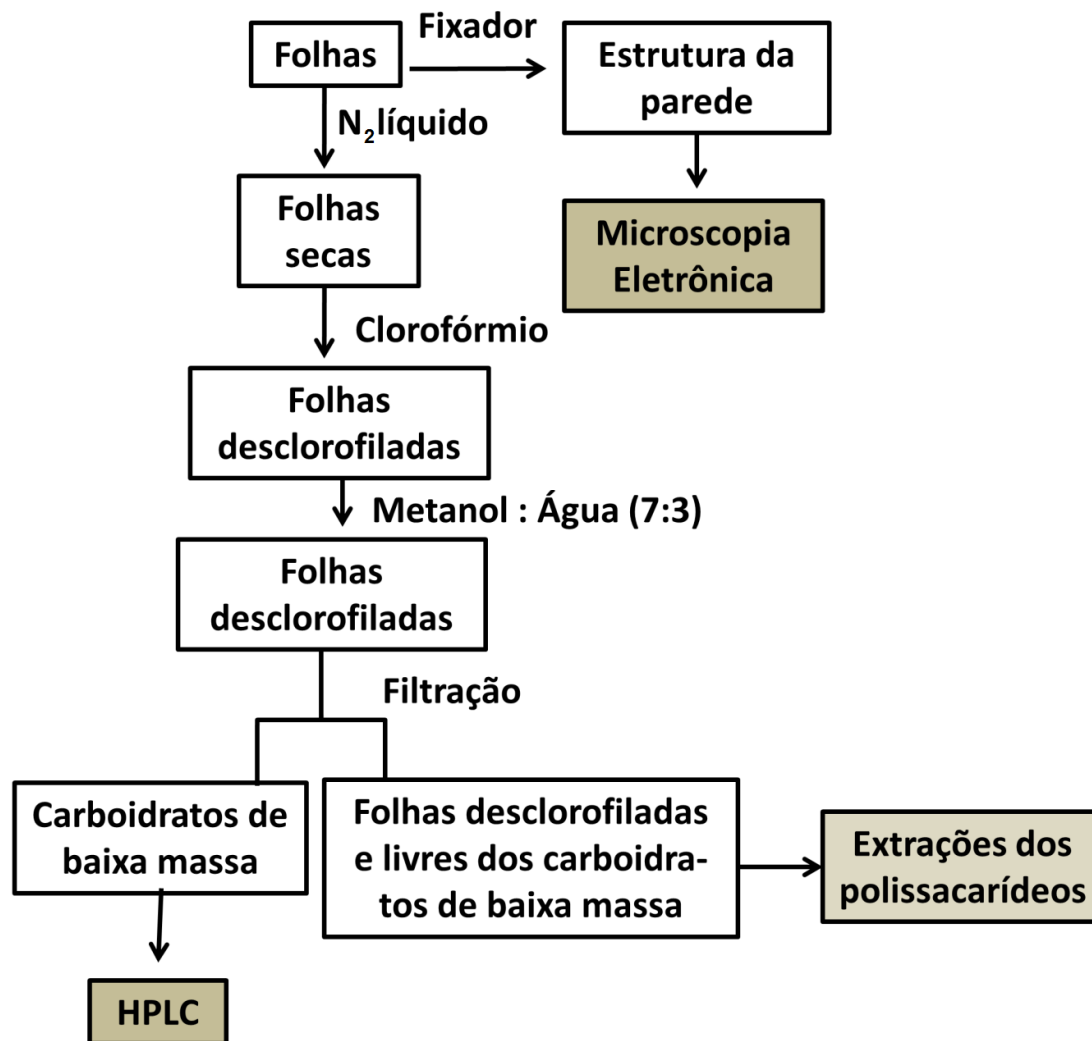


FIGURA 5- FLUXOGRAMA DE TRABALHO

#### 4.3.2 Polissacarídeos da parede celular

Após a remoção da clorofila e dos carboidratos de baixa massa as folhas foram submetidas a extrações sequenciais: com água a 80°C (3X, obtendo a fração W); EDTA 2% (m/v) a 30°C (2X, obtendo a fração E); NaOH 4 mol.L<sup>-1</sup> a 30°C (3X, obtendo a fração H30); NaOH 4 mol.L<sup>-1</sup> a 70°C (1X, obtendo a fração H70). Os polissacarídeos das frações foram precipitados com etanol 99% (3:1, v/v). Após a precipitação os polissacarídeos foram lavados com etanol absoluto (3X). As extrações alcalinas foram realizadas na presença de boroidreto de sódio (~3 mg). As frações obtidas com NaOH

4 mol.L<sup>-1</sup> e EDTA 2% (m/v) foram dissolvidas em água e dialisadas contra água corrente por 48 h e 120 h, respectivamente. Todos os polissacarídeos foram secos em estufa a vácuo a 25°C. O resíduo final insolúvel, proveniente das extrações, foi lavado com água destilada até a neutralidade, seguido de desidratação com etanol e acetona e seco a vácuo. O fluxograma de extração dos polissacarídeos está indicado na FIGURA 6.

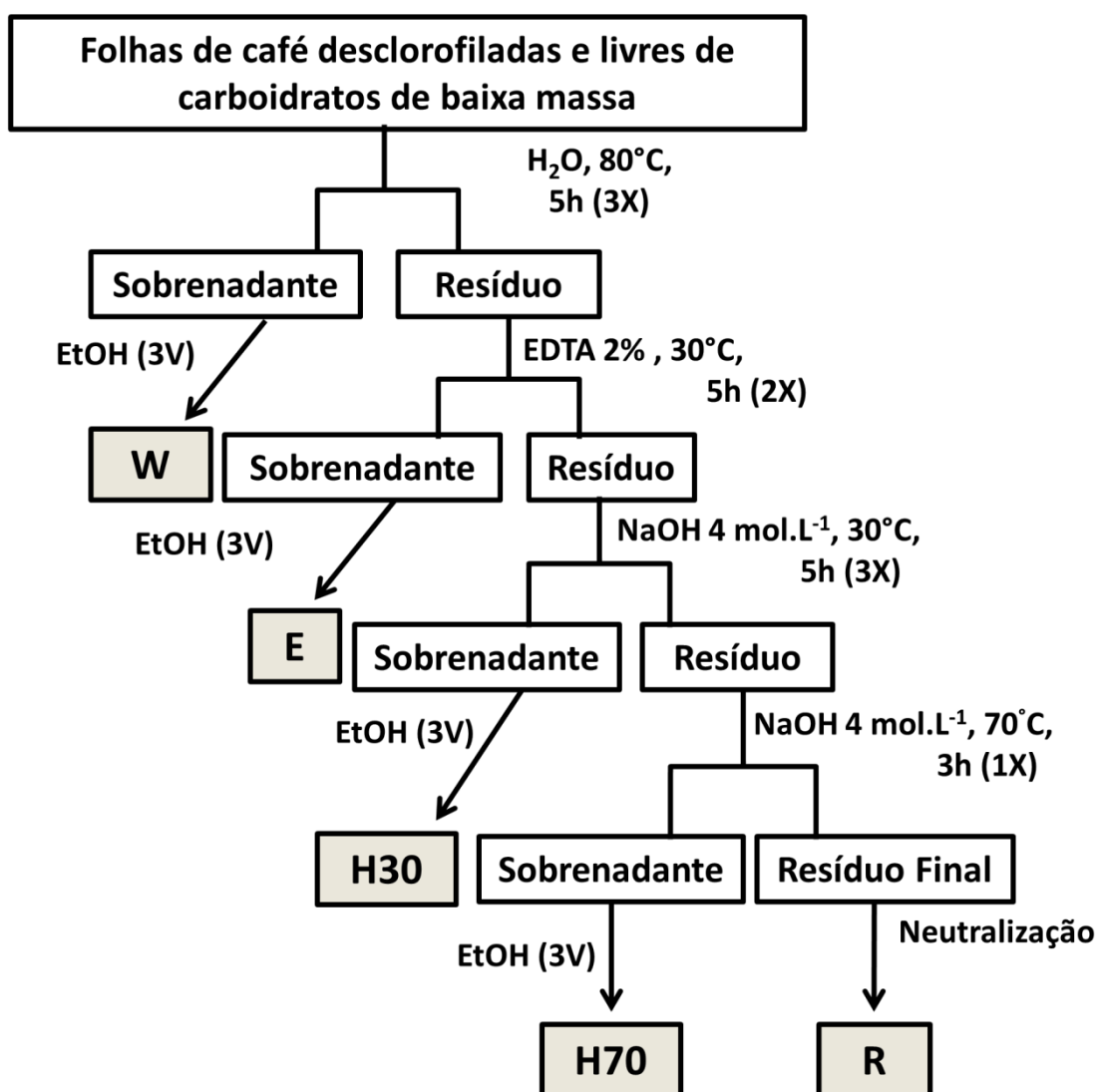


FIGURA 6- FLUXOGRAMA DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR DAS FOLHAS DE CAFÉ (*C. arabica* E *C. canephora*).

#### 4.4 TRATAMENTO ENZIMÁTICO PARA REMOÇÃO DO AMIDO

Previamente as extrações dos polissacarídeos, as folhas de *C. canephora* (clones 14 e 109A), bem como as frações polissacarídeos de *C. arabica*, foram tratadas com amilase e amiloglucosidase. Todas as frações de polissacarídeos solubilizadas da parede celular das folhas de *C. arabica* também foram submetidas a tratamento enzimático para a remoção de amido.

As frações ou a folha macerada livre de pigmentos e compostos de baixa massa foram solubilizadas em tampão tris-maleato pH 6,9 e adicionado 2 unidades de enzimas (Amilase (SIGMA<sup>®</sup>) e amiloglucosidase (MEGAZYME<sup>®</sup>)) por um período de 8 h a 45°C (BACIC; MOODY; CLARKE, 1986). As enzimas foram inativadas por fervura durante 5 min e o material centrifugado e lavado 3X com água e 1X com etanol P.A. e na sequência seco em estufa.

#### 4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)

Galactinol, rafinose e estaquiose foram quantificados usando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Foi utilizado equipamento Shimadzu (Japão) equipado com o módulo CBM-10A, forno CTO-10, bomba LC-10AD, detector de índice de refração RID-10A com coluna Supelcogel Pb (Supelco, USA), 30 cm X 78 mm e pré-coluna Supelcogel Pb, 5 cm X 4,6 mm. A fase móvel usada foi água ultrapura a 80°C a fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>.

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS MONOLIGNOIS

A oxidação com nitrobenzeno foi usada para determinar a composição monomérica da lignina (DEAN, 1997). O resíduo final insolúvel (20 mg) foi selado em ampola Pyrex<sup>®</sup> contendo 1,0 ml de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup> e 100 µL de nitrobenzeno e aquecido a 170°C por 2 h, com agitação ocasional da amostra



durante a reação. Após oxidação, a amostra foi resfriada em banho de gelo, lavadas 2X com clorofórmio, acidificada para pH 3-4 com HCl 5,0 mol.L<sup>-1</sup> e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspensos em metanol. Todas as amostras foram filtradas em filtro descartável de 0,45 µm (Hamilton<sup>®</sup> Co.) e analisada por HPLC. A fase móvel usada foi ácido acético 4% (v/v) em metanol/água (20/80, v/v) com fluxo de 1,2 ml.min<sup>-1</sup> para corrida isocrática de 20 min. A quantificação de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foi realizada a 290 nm, utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como µg monômero mg<sup>-1</sup> de monolignóis.

#### 4.7 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

Carboidratos totais foram determinados pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), com leitura a 490 nm e solução padrão de Glc nas concentrações de 20-100 µg.mL<sup>-1</sup>.

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada através do método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), tendo como solução padrão ácido galacturônico nas concentrações de 5-100 µg.mL<sup>-1</sup> e leitura a 525 nm.

Todas as análises foram efetuadas em triplicata e a absorbância foi medida em espectrofotômetro SP-22 Biospectro<sup>®</sup>.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

As hidrólises ácidas foram realizadas por dois métodos:

a) para as frações isoladas – Ácido trifluoroacético 2 mol.L<sup>-1</sup>, durante 5 h a 100°C. Ao término da hidrólise o ácido foi removido por evaporação (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

b) para o resíduo final insolúvel (fração lignocelulósica) – Ácido sulfúrico 72% (m/m), durante 2 h, em banho de gelo, seguido de diluição para 7% a 100°C, durante 8 h. Ao final da hidrólise o ácido foi neutralizado com carbonato de bário e o sal resultante removido por filtração (SAEMAN *et al.*, 1954).

Os produtos da hidrólise foram reduzidos com 3 mg de boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), em meio aquoso, a 25°C por 16 h (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Em seguida, as soluções reduzidas foram tratadas com ácido acético PA para decompor o excesso de agente redutor. A seguir, o material foi evaporado até securo em SpeedVac (Thermo Savant) e lavado sucessivamente com metanol para a remoção do ácido bórico remanescente, na forma de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados com anidrido acético PA (30 min, 100°C). O material foi novamente seco e o material acetilado extraído com clorofórmio e lavado 5X com água destilada (VINOGRADOV; WASSER, 2005). A fase clorofórmica foi transferida para tubo de hemólise, evaporada a temperatura ambiente e analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

Para as análises por GLC foi utilizado cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890 A II, equipado com detector de ionização em chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2 mL.min<sup>-1</sup>. Foi utilizada coluna capilar (30 m x 0,25 mm de diâmetro) DB-225, com espessura de filme 0,25 µm, sendo a temperatura do detector 300°C e do injetor 250°C. Todas as determinações de composição monossacarídica foram feitas em triplicata.

#### 4.9 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTO DESEMPENHO (HPSEC)

As amostras foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) 0,1 mol.L<sup>-1</sup> contendo azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) 200 ppm, em concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> e filtradas em membrana de acetato de celulose (Millipore) na porosidade de 0,2 µm.

As amostras foram injetadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alto desempenho (HPSEC) Waters, equipado com detector de índice de refração diferencial (RI) Waters modelo 2410. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação Waters em série, com limites de exclusão de  $7 \cdot 10^6$ ,  $4 \cdot 10^5$ ,  $8 \cdot 10^4$  e  $5 \cdot 10^3$  g.mol<sup>-1</sup>. As análises foram efetuadas a 25°C utilizando como eluente solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 mol.L<sup>-1</sup> contendo NaN<sub>3</sub> 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, monitorado através de bomba peristáltica Waters 515.

#### 4.10 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO INCORPORANDO TRANSFORMADOR *FOURIER* (FT-IR)

Previamente as análise por FT-IR, o KBr foi desidratado a 120°C durante 24 h e as amostras dessecadas a vácuo na presença de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. As análises por infravermelho, foram realizadas em espectrofotômetro BOMEM MB-100 (Hartman & Braun). Os espectros foram coletados no modo de absorbância na frequência de 2000-400 cm<sup>-1</sup>, em resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, 32 scans, empregando amostras sólidas pulverizadas. Foi utilizado KBr de grau espectroscópico e as pastilhas foram preparadas usando a proporção de 99:1 (m/m) de KBr:amostra.

#### 4.11 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As frações de interesse foram solubilizadas, dependendo da sua solubilidade, em óxido de deutério (D<sub>2</sub>O) puro ou em soluções levemente alcalinas, as análises foram efetuadas em tubos de 5 mm de diâmetro. As determinações de RMN foram realizadas no aparelho BRUKER, modelo AVANCE DRX-400 acoplado a transformador *Fourier*, com ressonância de <sup>13</sup>C, de 100 MHz, utilizando a temperatura de 70°C. Os deslocamentos foram expressos em ppm.

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média de dois a quatro experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média. A análise de variância para testar a significância das diferenças observadas foi realizada com o programa estatístico Prisma<sup>®</sup> (Versão 5.0). ANOVA foi aplicado para verificar as significâncias das variações observadas. Diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste Tukey e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os polissacarídeos da parede celular podem ser extraídos diferencialmente (ALBERSHEIM *et al.*, 1994; SCHÄDEL *et al.*, 2010). As extrações sequenciais usadas neste trabalho foram: com água (fração W) e agente quelante de cálcio, EDTA (fração E) para pectinas (frações W e E) e com soluções alcalinas (NaOH 4 mol.L<sup>-1</sup>) para hemiceluloses (frações H30 e H70). O rendimento e a composição dos polissacarídeos extraídos, bem com do resíduo final insolúvel representando a fração lignocelulósica da parede celular (fração R) foram avaliados. Os resultados obtidos para as plantas de café submetidas aos diferentes tipos de estresse abiótico serão apresentados na sequência. Devido à presença de amido no material de estudo, foram realizados tratamentos com amilase e amiloglucosidase. Assim, os resultados apresentados referem-se às frações após o tratamento enzimático para a remoção do amido.

### 5.1 ESTRESSE TÉRMICO

#### 5.1.1 Rendimento das frações de polissacarídeos

As plantas de *C. arabica* submetidas ao estresse térmico apresentavam 22 meses de idade e cerca de 70 cm de altura. O rendimento obtido para as frações extraídas das folhas das plantas de *C. arabica* foi: hemiceluloses > celulose > pectinas (TABELA 1). Resultados semelhantes foram encontrados em folhas de *A. thaliana* (ZABLACKIS *et al.*, 1995).

Durante o estresse térmico houve alteração dos rendimentos de todas as frações dos polissacarídeos comparados ao controle. O rendimento das pectinas foi diminuído, enquanto o das hemiceluloses foi aumentado (TABELA 1). Não foram encontrados na literatura dados relacionados a

alterações nos polissacarídeos em resposta ao estresse térmico. No entanto, há relatos de alterações em resposta ao estresse hídrico (LEUCCI *et al.*, 2008) e salino (IRAKI *et al.*, 1989b).

TABELA 1- RENDIMENTO (EM %<sup>a</sup>) DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO

Dias/Fração	PECTINAS		HEMICELULOSES		CELULOSE
	W (%)	E (%)	H30 (%)	H70 (%)	R (%)
Controle	10,3	4,8	16,7	2,9	18,4
Dia 3	5,3	4,5	25,3	3,2	17,0
Dia 5	4,8	3,2	22,7	2,8	16,6

<sup>a</sup> Em relação as folhas desclorofiladas e livres de carboidratos de baixa massa;

NOTA: Controle - Plantas cultivadas por 7 dias a 24°C; DIA 3 - Plantas cultivadas por 3 dias a 37°C; DIA 5 – Plantas cultivadas por 5 dias a 37°C.

A redução das pectinas extraídas foi mais pronunciada na fração obtida com água a 80°C (TABELA 1) do que na fração extraída com quelante de Ca<sup>2+</sup>. Enquanto a fração extraída com água quente é mais fracamente ligada, a fração péctica extraída com EDTA é proporcionalmente mais fortemente ligada à parede celular. As alterações observadas na extratibilidade dos polissacarídeos pécticos sugerem que o estresse térmico induz a mudanças na organização das pectinas. As raízes de trigo (*T. durum*) tolerantes ao estresse hídrico (LEUCCI *et al.*, 2008) e células de tabaco (*N. tabacum*) tolerantes ao estresse salino e osmótico (IRAKI *et al.*, 1989a) apresentaram resultados semelhantes. Esta redução da solubilidade de pectinas pode estar relacionada a maiores interações entre estes polissacarídeos na matriz da parede celular. Assim, as pectinas poderiam estar se associando fortemente as hemiceluloses impedindo sua solubilização na fração péctica. O aumento da solubilidade das hemiceluloses foi mais pronunciado nas frações extraídas a 30°C (frações H30). O aumento das ligações entre polímeros na parede celular podem estar relacionados à presença ROS (ZHOU *et al.*, 2010), associadas ao estresse térmico (GOMEZ *et al.*, 2008; HAMEED; GOHER; IQBAL, 2011).

O rendimento da fração celulósica sofreu leve decréscimo com o estresse térmico (TABELA 1). Resultados semelhantes foram obtidos em cultivares de raízes de trigo (*T. durum*) (LEUCCI *et al.*, 2008) e em células de tabaco (*N. tabacum*) em condição de estresse hídrico (IRAKI *et al.*, 1989a).

### 5.1.2 Polissacarídeos da fração W

Ara e Gal foram os componentes mais abundantes da fração W (FIGURA 7A), provavelmente relacionados à arabinanas, galactanas e/ou arabinogalactanas que são ubíquos constituintes das cadeias laterais de ramnogalacturonanas na parede primária de eudicotiledôneas, destacando-se a presença de arabinogalactanas. Existem dois grupos de arabinogalactanas. Arabinogalactanas do tipo I são tipicamente associadas com pectinas, enquanto as do tipo II são associadas com proteínas sendo chamadas de arabinogalactanas-proteínas. Arabinogalactanas do tipo I foram extraídas com água quente de folhas de eudicotiledôneas (DUAN *et al.*, 2004) e, com o mesmo solvente, foi isolado arabinogalactanas do tipo II de grãos de café (*C. arabica*) (CAPEK *et al.*, 2010). O espectro de FT-IR da fração W confirmou a presença de arabinogalactanas do tipo II (FIGURA 7B), indicadas pelas bandas de 1139, 1078 e 1043  $\text{cm}^{-1}$  (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000). Além disto, a banda entre 1600 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a proteínas (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 1999), corroborando com a presença de arabinogalactanas tipo II.

Como esperado, ácidos urônicos e Rha, componentes das cadeias de homogalacturonanas e ramnogalacturonanas também foram encontrados na fração W. Glc, Man, Xyl e menores concentrações de fucose (Fuc) também foram detectadas. A ocorrência de Man e Glc poderia estar relacionada à presença de hemiceluloses, como glucomananas, solubilizadas das folhas de *Ginkgo biloba* com água quente (YANG; ZHOU; LIANG, 2009) e salva (*Salvia officinalis*) (CAPEK, 2009). Xyl pode ser derivada de xilogalacturonanas, identificada nas folhas de caqui (*D. kaki*) (DUAN *et al.*, 2003) e relatada em vários tecidos de *A. thaliana* (ZANDLEVEN *et al.*, 2007) e em cotilédones de soja (*Glycine max*) (NAKAMURA *et al.*, 2002).

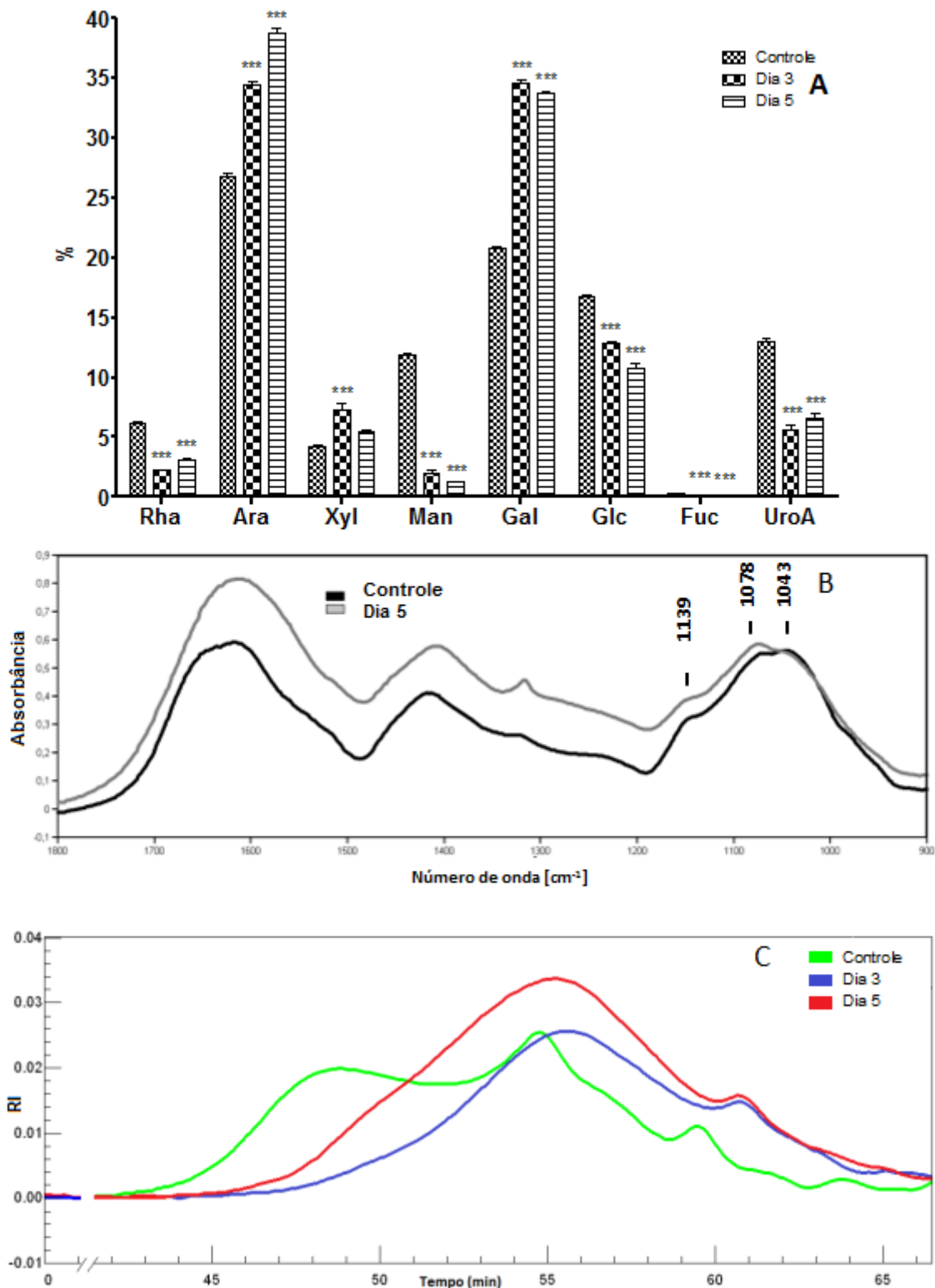


FIGURA 7- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC (C) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO.

NOTA: Controle - plantas cultivadas por 7 dias a 24°C; Dia 3 - plantas cultivadas por 3 dias a 37°C; Dia 5 - plantas cultivadas por 5 dias a 37°C. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de aldito; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .



Após o estresse térmico, as concentrações de Ara e Gal aumentaram, enquanto a percentagem de Man, Glc, ácidos urônicos, Rha e Fuc diminuiu. O aumento no conteúdo de Ara e Gal sugere alterações relacionadas às arabinogalactanas. Foi proposto que arabinogalactanas do tipo II podem estar envolvidas na rigidificação da parede celular por estresse oxidativo (SEIFERT; ROBERTS, 2007) e o aumento na sua concentração relacionado com aumento da capacidade de retenção de água (FINCHER; STONE, 1983).

A redução no conteúdo de Rha e de ácidos urônicos na fração W está em concordância com a hipótese proposta por Iraki *et al.* (1989b) que submeteu células de tabaco (*N. tabacum*) ao estresse osmótico e salino causando desorganização na parede celular. É possível que em condições de excesso de calor, as associações entre pectinas e polissacarídeos tornem-se mais fortes, reduzindo sua extratibilidade.

A porosidade da parede celular é regulada por pectinas (BARON-EPEL; GHARYAL; SCHINDLER, 1988). Redução no conteúdo de pectinas poderia resultar em poros alargados, que contribuiriam com o aumento da condutividade do calor por evaporação. Um efeito oposto foi relatado para plantas submetidas a estresse por congelamento (ASHWORTH; ABELES, 1984).

O perfil de eluição por HPSEC da fração W está apresentado na FIGURA 7C. Na fração controle foram identificados quatro picos principais com tempos de eluição de 48, 54, 59 e 64 min. No entanto, para a fração obtida das plantas submetidas ao estresse térmico, somente dois picos foram identificados: um pico principal em 55 min e um pico secundário em 61 min. Como o estresse térmico resulta em aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (WAHID *et al.*, 2007) este poderia contribuir com aumento das ligações cruzadas entre os polímeros da parede celular, portanto alterando a massa molecular média dos polissacarídeos.

Foi proposto também que arabinogalactanas do tipo II participam na modulação da mecânica da parede celular sobre condições de estresse via rigidificação da parede celular por aumento das ligações cruzadas (SEIFERT; ROBERTS, 2007). Estas mudanças poderiam causar redução na extensibilidade e prevenir o relaxamento da parede celular.

As modificações observadas na parede celular para plantas de café submetidas ao estresse térmico apresentam similaridades com aquelas observadas para plantas submetidas aos estresses osmótico e hídrico (IRAKI *et al.*, 1989a; IRAKI *et al.*, 1989b; ZWIAZEK, 1991; RENAULT; ZWIAZEK, 1997), sugerindo papel similar para a parede celular em resposta aos estresses abióticos.

Infelizmente, após o tratamento enzimático para remoção do amido da fração E, não sobrou material suficiente para análises químicas.

### 5.1.3 Polissacarídeos das frações hemicelulósicas

A composição monossacarídica das frações hemicelulósicas extraídas a 30°C e a 70°C apresentaram como principais monossacarídeos Xyl e Ara, sugerindo a presença de arabinoxilanas (FIGURA 8A e 9A). Resultados semelhantes foram descritos para a fração hemicelulósica de folhas de *C. arabica* L. var Mundo Novo (CECY; CORRÊA, 1984). Wenzel e Corrêa (1977) identificaram 4-metil-glucuronoxilana na fração hemicelulósica da mesma espécie (AWANO *et al.*, 2000; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

O espectro de FT-IR das frações H30 e H70 (FIGURA 8C e 9C) apresentaram bandas relacionadas a arabinoxilanas ( $1078\text{ cm}^{-1}$ ) e glucuronoxilanas ( $1147$  e  $1043\text{ cm}^{-1}$ ) (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000). As 4-metil-glucuronoxilanas são as hemiceluloses mais importantes da parede secundária de fibras e elementos de vasos de plantas eudicotiledôneas (YORK; ONEILL, 2008).

Glc, Gal e Man estavam presentes em altas concentrações na fração H30, enquanto que altas percentagens de Rha e ácidos urônicos foram observados na fração H70. Pequenas quantidades de Fuc, provavelmente proveniente de xiloglucanas, foram também detectadas. Estes dados estão em concordância com os já publicados para fração hemicelulósica de folhas de jatobá (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001), de chicória (*Cichorium intybus*) (SUN *et al.*, 2006) e de *A. thaliana* (ZABLACKIS *et al.*, 1995). De acordo com o modelo mais aceito para parede celular primária de

eudicotiledôneas, a principal hemicelulose é a xiloglucana com pequenas quantidades de glucuronoarabinoxilanas, glucomananas, galactoglucomananas e galactomananas. Hipotetizar!!!

Durante o estresse térmico, a concentração de Xyl diminuiu na fração H30, enquanto a de Gal e a de ácidos urônicos aumentaram. Os resultados indicam que o estresse térmico diminuiu a quantidade de xilanas extraídas a 30°C, corroborando a hipótese de maior interação entre os polissacarídeos da parede celular submetida ao estresse térmico reforçando o seu papel no enrijecimento da parede celular (PARK; COSGROVE, 2011).

Os resultados obtidos com café são diferentes daqueles descritos por Zhang *et al.* (2010a). Estes autores observaram que altas temperaturas aumentam a concentração de arabinoxilanas (especialmente as arabinoxilanas mais solúveis) em trigo (*T. aestivum*). As diferenças nas respostas para café e trigo (*T. aestivum*) podem ser atribuídas aos diferentes padrões da parede celular. Café tem parede primária do tipo I enquanto trigo (*T. aestivum*) tem parede primária do tipo II. De acordo com estes autores, as arabinoxilanas foram correlacionadas positivamente com o uso eficiente da água, sugerindo que arabinoxilanas podem aumentar a eficiência do uso da água.

Xiloglucanas interagem com microfibrilas de celulose (ACEBES *et al.*, 1993) enrijecendo a parede celular (CHANLIAUD *et al.*, 2004). Assim, a redução da extração de xiloglucanas nas plantas submetidas a estresse térmico, evidenciada pela redução na quantidade de Fuc, poderia também estar relacionada ao enrijecimento da parede celular por aumento nas interações entre as xiloglucanas e as microfibrilas de celulose.

Durante o estresse térmico, a redução da fração péctica extraída (TABELA 1) e o aumento no conteúdo de ácidos urônicos nas frações hemicelulósicas H30 (FIGURA 8A e B) estão em concordância com a hipótese de aumento das interações entre os polissacarídeos. Evidências de ligações covalentes entre pectinas e xiloglucanas já foram relatadas (THOMPSON; FRY, 2000; POPPER, 2005).

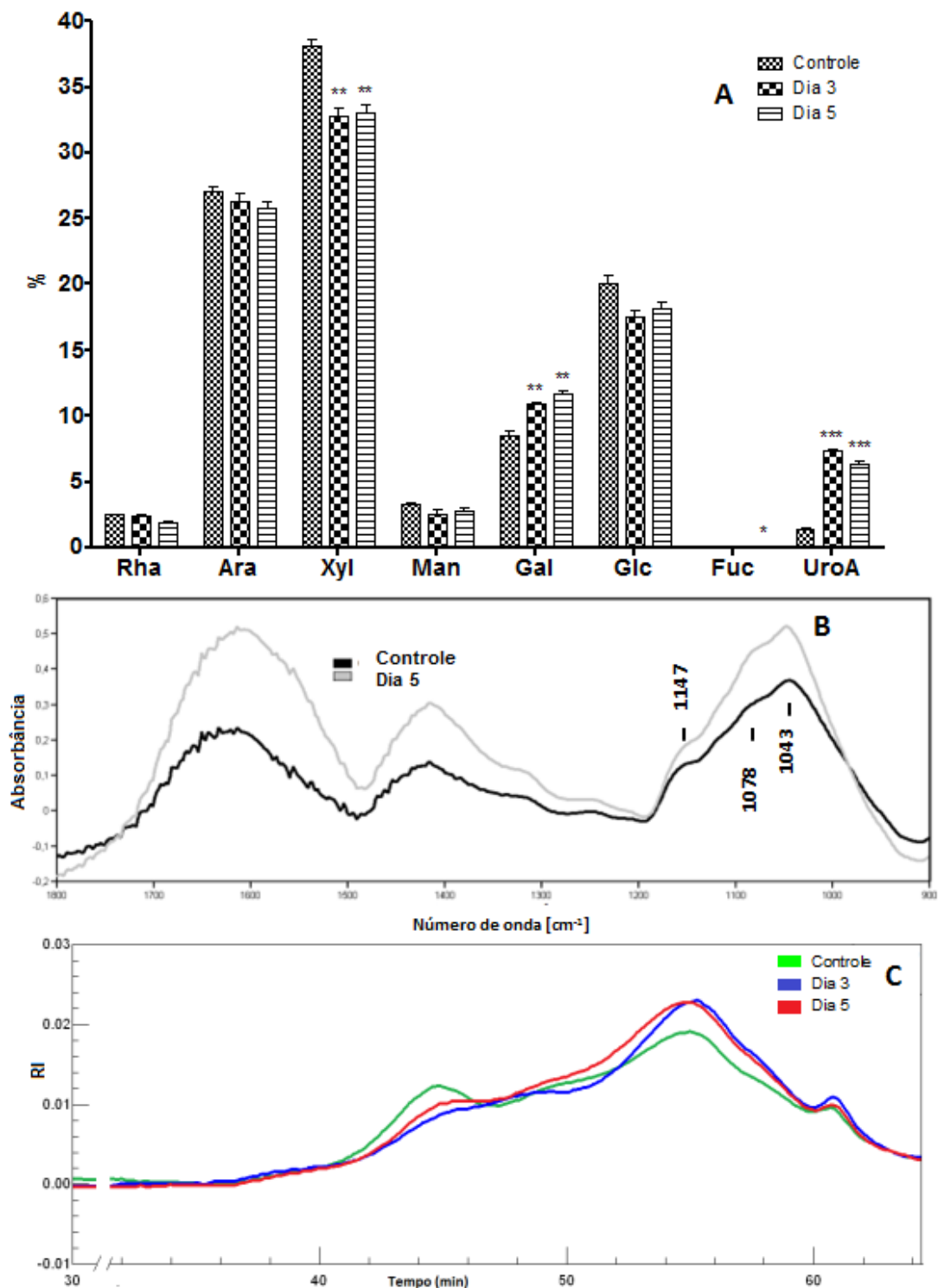


FIGURA 8- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE R (C) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO.

NOTA: Controle - plantas cultivadas por 7 dias a 24°C; Dia 3 - plantas cultivadas por 3 dias a 37°C; Dia 5 - plantas cultivadas por 5 dias a 37°C. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Os perfis de eluição por HPSEC das frações H30 controle e submetidas a estresse térmico apresentaram três principais picos, em 44, 55 e 61 min (FIGURA 8C). Durante o estresse térmico, foram detectadas alterações na intensidade destes picos em comparação ao controle. Nas frações provenientes de plantas que foram submetidas a estresse térmico os picos correspondentes aos polissacarídeos maiores diminuíram. Entretanto, houve aumento na intensidade dos picos correspondentes aos polissacarídeos menores (FIGURA 8C). Esse resultado pode estar relacionado a interações mais fortes entre os polissacarídeos maiores na parede celular, enquanto que os menores interagem menos e são extraídos mais facilmente.

Similarmente a fração H30, a fração H70 apresentou Ara e Xyl como principais monossacarídeos (FIGURA 9A). Estes resultados também são semelhantes aos encontrados para hemiceluloses de folhas de jatobá (*Hymenaea courbaril*) extraídas com álcali forte (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001). A fração H70 apresentou maiores concentrações de Rha e ácidos urônicos comparados a fração H30, indicando maior extração de pectinas. No entanto, o aumento de ácidos urônicos pode também estar relacionado à extração de glucuronoxilanas, hemiceluloses típicas de parede secundária em eudicotiledôneas (KARDOSOVÁ; MATULOVÁ; MALOVÍKOVÁ, 1998; CEUSTERS *et al.*, 2008) e encontradas em folhas de café (*C. arabica*) (WENZEL; CORRÊA, 1977; CECY; CORRÊA, 1984).

Em comparação ao controle, as frações H70 obtidas de plantas submetidas a estresse térmico apresentaram maior conteúdo de Xyl, enquanto Ara e Glc diminuíram (FIGURA 9A). Porém, não foram observadas diferenças entre os outros monossacarídeos. O aumento de Xyl associado com o decréscimo no conteúdo de Ara poderia estar relacionado a maior associação das arabinoxilanas com fibras de celulose. Acredita-se que substituições de Ara bloqueiam as associações por ligações de hidrogênio entre arabinoxilanas e microfibrilas de celulose aumentando sua solubilidade em água (URAHARA *et al.*, 2004).

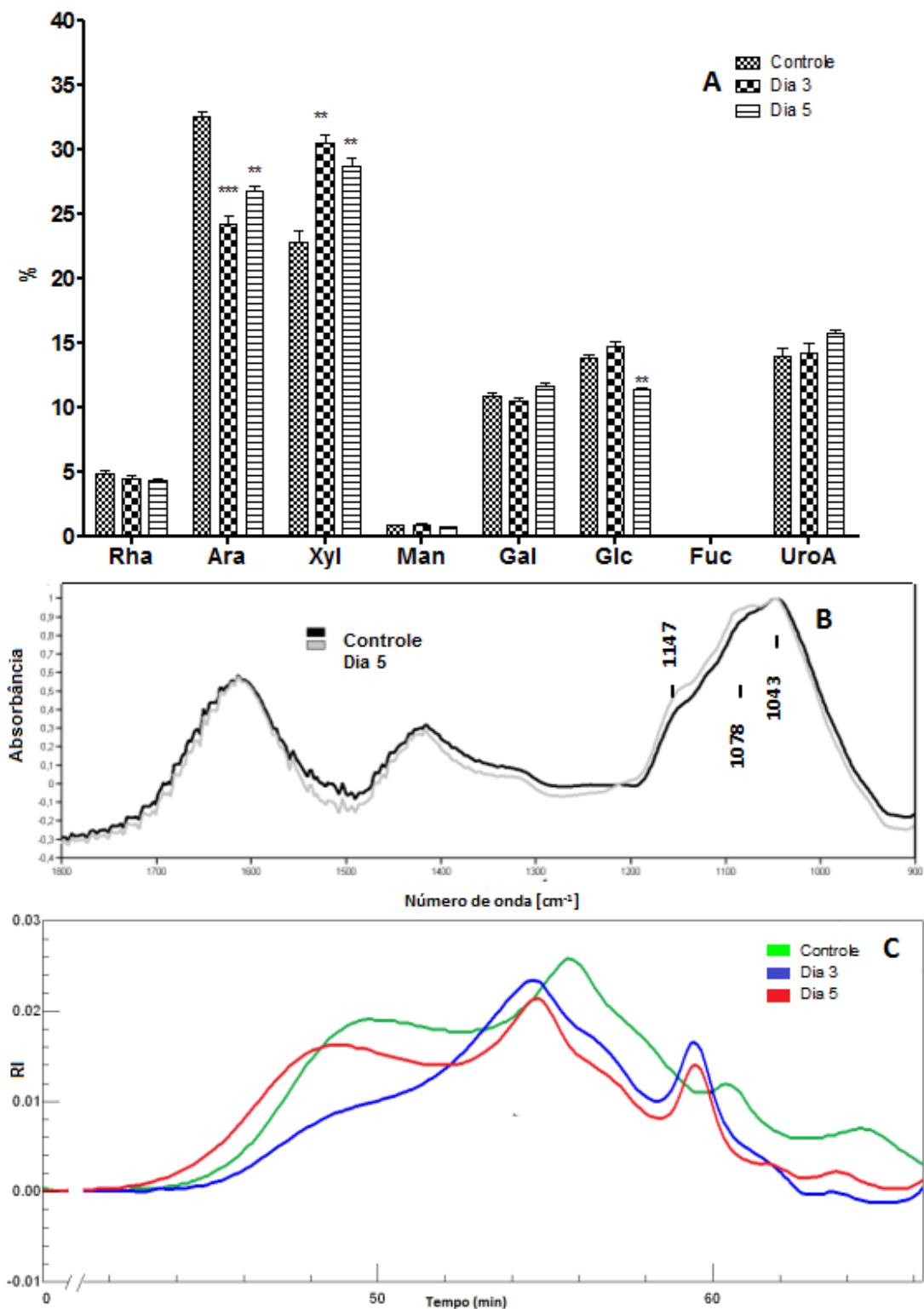


FIGURA 9- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (C) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO.

NOTA: Controle - plantas cultivadas por 7 dias a 24°C; Dia 3 - plantas cultivadas por 3 dias a 37°C; Dia 5 - plantas cultivadas por 5 dias a 37°C. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de aldito; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Em relação ao espectro de FT-IR, a fração H70 (FIGURA 9B) também apresentou as mesmas bandas da fração H30, sugerindo a presença das mesmas hemiceluloses nas duas frações. Porém, não apresentou aumento da intensidade destas bandas como visto na fração H30 em condições de estresse.

O perfil de eluição por HPSEC das frações H70 possui quatro picos principais. Há alteração nos perfis de eluição durante três e cinco dias de estresse térmico. Os três picos no final do cromatograma foram deslocados para tempos de eluição menores, indicando aumento da massa molecular (FIGURA 9C). O pico que elui antes de 50 min também foi deslocado para menor tempo de eluição na fração obtida de plantas submetidas a cinco dias de estresse térmico. Estes resultados indicam aumento no tamanho dos polissacarídeos nesta fração, corroborando com a ideia de associações entre os polissacarídeos.

#### 5.1.4 Polissacarídeos e monolignóis da fração lignocelulósica

Como esperado, no resíduo final insolúvel foi observado Glc como principal monossacarídeo (FIGURA 10A). No entanto, o resíduo final apresentou elevado conteúdo de monossacarídeos não celulósicos. O mais abundante destes foi Xyl, seguido por Ara, ácidos urônicos, Gal, Man, Rha e traços de Fuc. De acordo com Eldmann e Fry (1992), a solução de álcali  $4 \text{ mol.L}^{-1}$ , comumente utilizada, não é completamente efetiva para a extração de hemiceluloses, requerendo o emprego de  $\text{NaOH } 6 \text{ mol.L}^{-1}$ .

A presença de parede secundária no material de estudo foi confirmada pelas análises de monômeros da lignina na fração R (FIGURA 10B). A composição dos monômeros apresentou a forma G e S como principais tipos presentes nos resíduos das folhas de café, os quais ocorrem principalmente em angiospermas (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

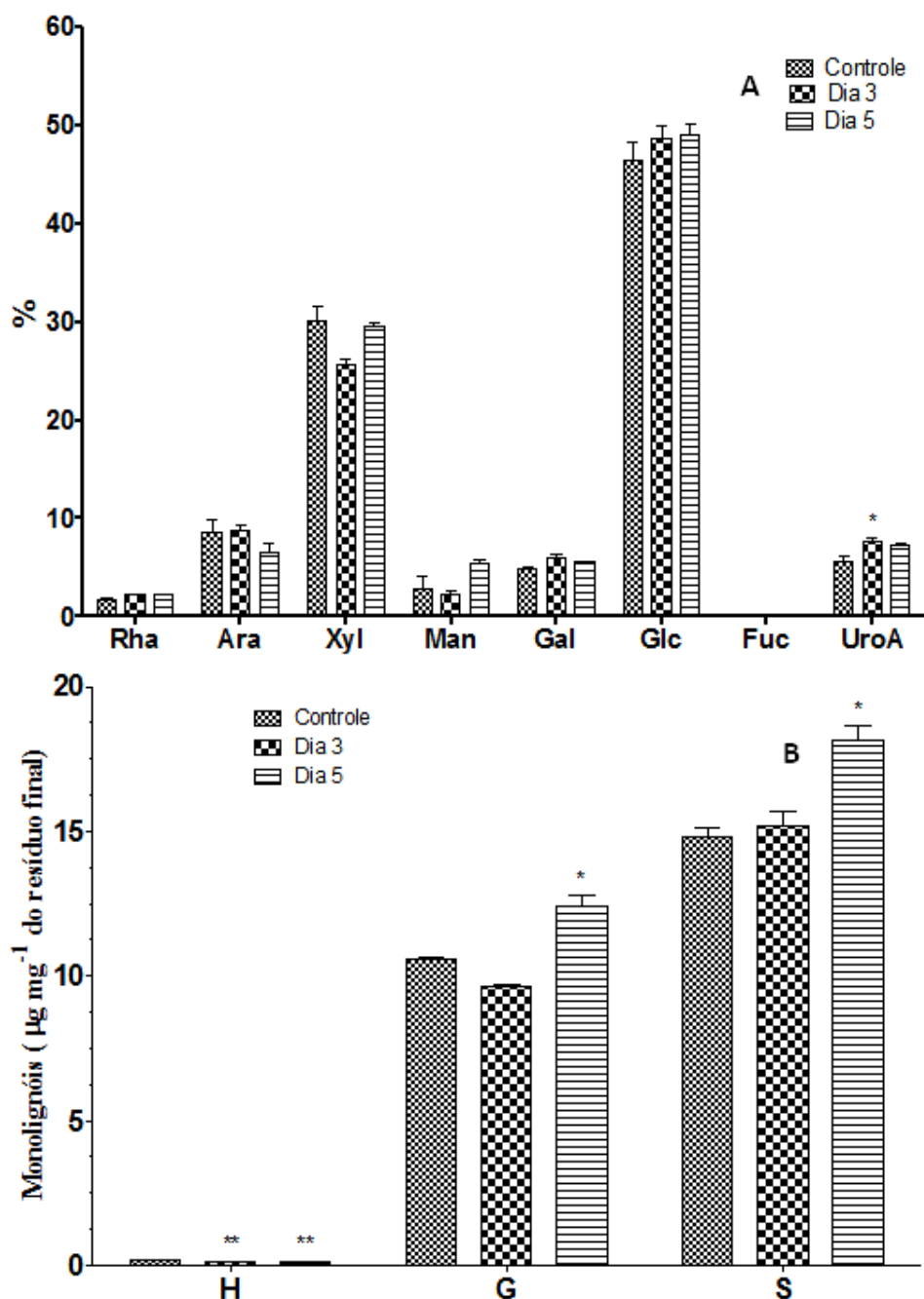


FIGURA 10- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E DOS MONOLIGNOIS (B) DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO.

NOTA: Controle - plantas cultivadas por 7 dias a 24°C; Dia 3 - plantas cultivadas por 3 dias a 37°C; Dia 5 – plantas cultivadas por 5 dias a 37°C. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Monolignóis na forma aldeídica determinados por HPLC. Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .



Durante as condições de estresse houve aumento na concentração das formas G e S e leve decréscimo da forma H. Este aumento no conteúdo de monolignol corrobora os resultados obtidos de folhas de morango (*Fragaria ananassa*) submetidas ao estresse térmico (GULEN; ERIS, 2004). A polimerização de lignina requer peroxidases ou lacases mais  $H_2O_2$  (MOURA *et al.*, 2010). O estresse térmico foi relacionado como causador maior produção de ROS e  $H_2O_2$  em plantas (SUZUKI; MITLLER, 2006). Esta condição poderia gerar  $H_2O_2$  na folha de café estimulando a polimerização dos monolignóis (WAKABAYASHI; SOGA; HOSON, 2011).

### 5.1.5 Microscopia óptica e eletrônica

O mesofilo foliar de *C. arabica* é organizado como uma camada de células alongadas do parênquima paliçádico e células de menores proporções do parênquima esponjoso que possuem formas irregulares, portanto permitem a passagem de gases através dos espaços intercelulares (FIGURA 11A e C). No entanto, durante cinco dias de estresse térmico, as células do parênquima paliçádico apresentaram-se mais separadas e finas comparadas as células-controle. Conseqüentemente, as espessuras totais das folhas também diminuiram (FIGURA 11B e D).

A microscopia eletrônica mostrou que as células do mesofilo controle tinha grandes quantidades de amido no citoplasma, entretanto, durante cinco dias de estresse térmico, observou-se fragmentação destes grânulos (FIGURA 12A-D). Adicionalmente, nas células controle, os cloroplastos estavam organizados e continham plastoglobulo como reserva de lipídeos. Durante cinco dias de estresse térmico, as membranas dos tilacoides foram danificadas com perda da organização do empacotamento da grana. Estes tipos de efeitos foram observados em folhas de outras plantas em condições de estresse térmico (ZHANG *et al.*, 2009a; ZHANG *et al.*, 2010b; DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2011), salino (ZHEN *et al.*, 2011) e hídrico (WANG *et al.*, 2011).

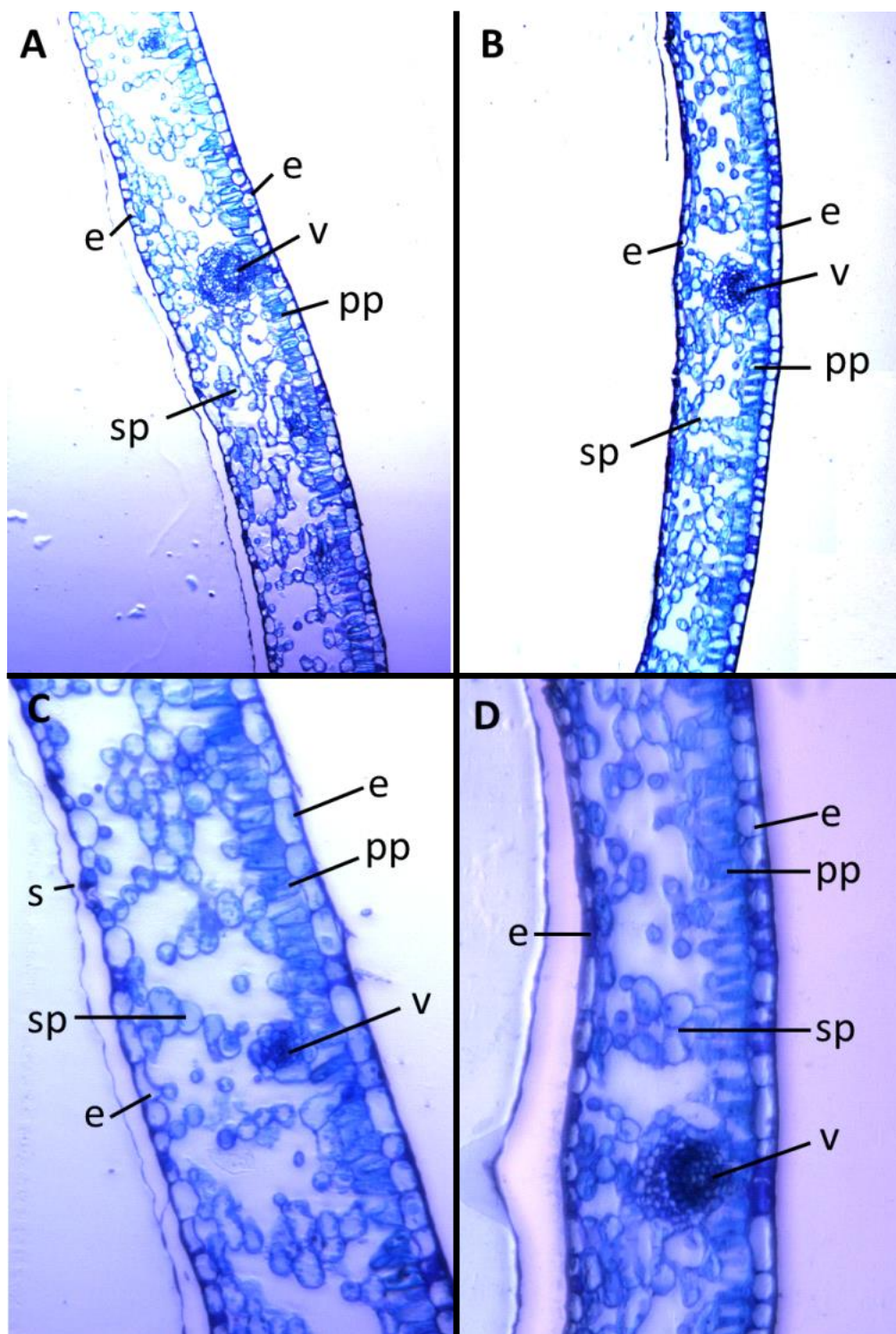


FIGURA 11- ESTRUTURAS MICROSCÓPICAS DAS FOLHAS DE *C. arabica*: CONTROLE (100x) (A); APÓS CINCO DIAS DE ESTRESSE TÉRMICO (100x) (B); CONTROLE (200x) (C); E APÓS CINCO DIAS DE ESTRESSE TÉRMICO (200x) (D).

NOTA: Epiderme (e); Vasos (xilema e floema) (v); Parênquima Esponjoso (sp); Parênquima Paliádico (pp); Estômato (s). Coloração com azul de toluidina 0,05% (m/v).

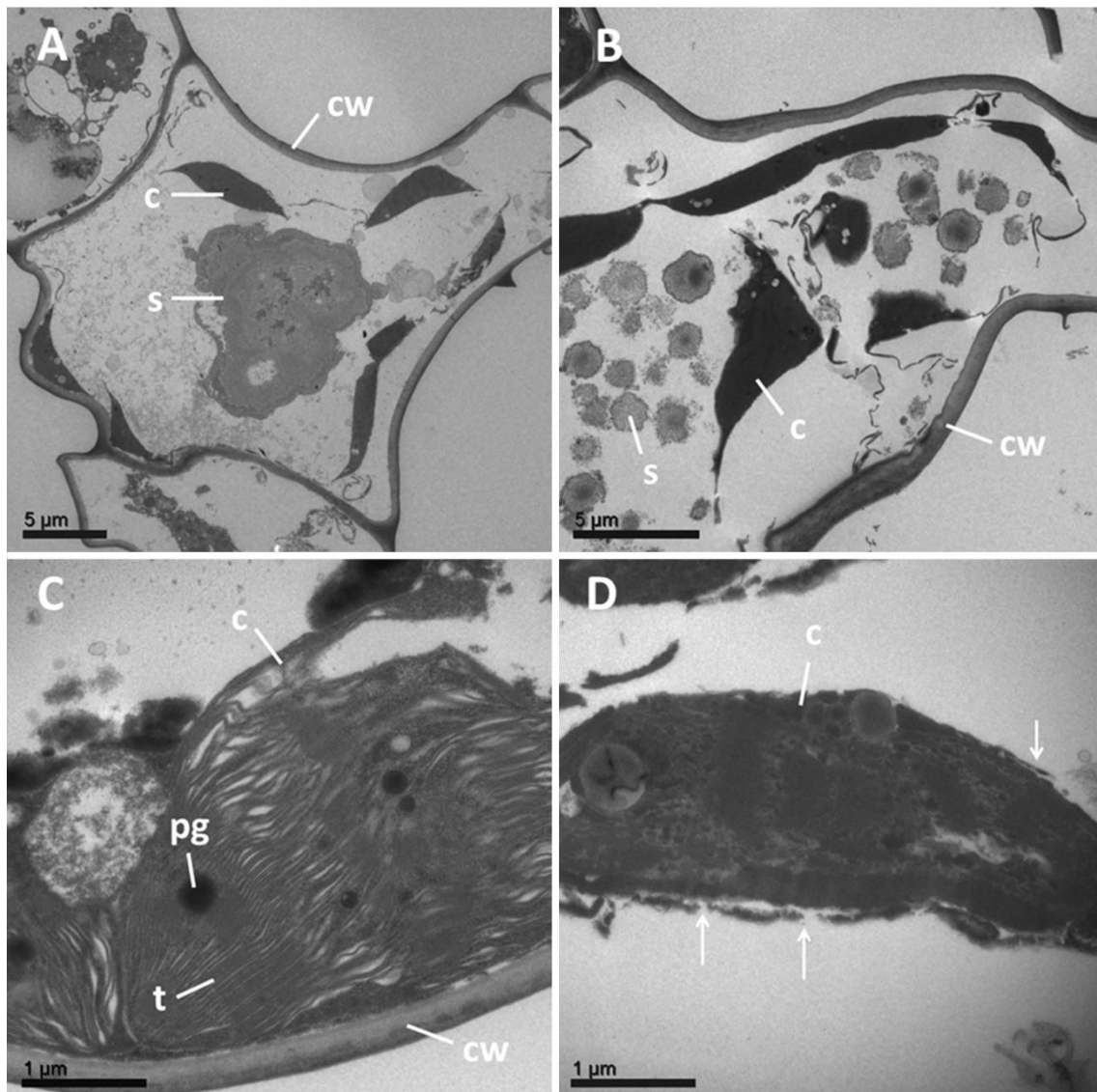


FIGURA 12- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE *C. arabica*. CÉLULAS CONTROLE (A); APÓS CINCO DIAS DE ESTRESSE TÉRMICO (B); CLOROPLASTOS CONTROLE (C); E CLOROPLASTOS APÓS CINCO DIAS DE ESTRESSE TÉRMICO (D).

NOTA: Parede Celular (CW); Mitocôndria (M); Plastoglóbulo (PG); Cloroplastos (C); Tilacoides (T); E Amido (S).

## 5.2 ESTRESSE SALINO

### 5.2.1 Rendimento das frações de polissacarídeos

As plantas de *C. arabica* submetidas ao estresse salino eram mais jovens que as plantas submetidas aos estresses térmico e hídrico, tinham apenas 6 meses de idade. Os resultados dos rendimentos obtidos com as extrações sequencias estão na TABELA 2. O maior rendimento foi detectado nas frações hemicelulósicas, seguido da fração lignocelulósica e pectinas. Resultados semelhantes foram obtidos em coleóptilos de milho (*Z. Coleopiles*) (CARPITA, 1983) e parênquima de feijão (*Phaseolus coccineus*) (O'NEILL; SELVENDRAN, 1983).

O estresse salino diminuiu a solubilização de pectinas extraídas com água e das hemiceluloses extraídas a 30°C, aumentando o conteúdo do resíduo final insolúvel nas folhas de *C. arabica* (TABELA 2). A menor extração dos componentes da matriz da parede celular juntamente com o aumento do resíduo final insolúvel sugere que em condições de estresse salino ocorre o aumento das associações entre estes polímeros. Plantas de alfafa (*Medicago sativa*) com parede celular menos rígida pela inibição da síntese de lignina aumentaram a solubilização de pectinas e hemiceluloses (PATTATHIL *et al.*, 2012). Desse modo, a redução da solubilização de pectinas e hemiceluloses poderia ser correlacionada com enrijecimento da parede celular.

Iraki, Bressan e Carpita, (1989) relataram alterações na extração de polissacarídeos de células de tabaco (*N. tabacum*) submetidas ao estresse salino. Esses autores sugeriram que as hemiceluloses se associam mais fortemente a parede celular, diminuindo o conteúdo de hemiceluloses liberado no meio de cultura no estresse salino. Adicionalmente, é sabido que para o crescimento celular é necessário o afrouxamento dos polissacarídeos na parede celular (COSGROVE, 1999). Assim, uma das consequências do estresse salino seria a redução do crescimento das plantas (FIGUEIRÊDO; FARIA; SILVA, 2005; NAZÁRIO *et al.*, 2010) devido a maior associação entre

os polímeros da parede celular, dificultando o afrouxamento e limitando o crescimento (HUANG; BECKER; JONES, 2012).

TABELA 2- RENDIMENTO (EM %<sup>a</sup>) DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO.

Dias/Fração	PECTINAS		HEMICELULOSES		CELULOSE
	W (%)	E (%)	H30 (%)	H70 (%)	R (%)
Dia 0 (Controle)	7,3	3,3	23,6	2,0	11,7
Dia 3	3,2	2,4	17,3	4,2	17,1
Dia 6	4,4	5,9	14,6	4,2	15,2
Dia 12	5,7	5,4	11,5	3,0	17,0
Dia 25	3,9	5,5	14,5	2,6	17,3

<sup>a</sup> Em relação as folhas desclorofiladas e livres de carboidratos de baixa massa  
 NOTA: Plantas irrigadas com solução nutritiva - Controle; Dia 3, 6, 12 e 25 correspondem a plantas irrigadas com 150 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl por 3, 6, 12 e 25 dias, respectivamente.

O aumento das ligações entre polímeros na parede celular estão diretamente relacionados aos ROS (ZHOU *et al.*, 2010), que estão associados como resposta ao estresse salino (BOTELLA *et al.*, 1994; GORETA *et al.*, 2008; CHAWLA; JAIN; JAIN, 2012). Portanto, estes resultados sugerem que o estresse salino induz a mudanças na organização dos polímeros da parede celular modificando sua extratibilidade.

### 5.2.2 Polissacarídeos da fração W

Ara e Gal são os monossacarídeos mais abundantes na fração W (FIGURA 17A), sugerindo a presença de arabinogalactanas como relatado para *A. thaliana* (ZANDLEVEN *et al.*, 2007). O espectro de FT-IR da fração W confirmou a presença de arabinogalactanas tipo II (FIGURA 17B), indicadas pelas bandas de 1076 e 1043 cm<sup>-1</sup> (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000). Algumas bandas foram atribuídas a homogalacturonanas (1645, 1325, 1150, 1100,

1020  $\text{cm}^{-1}$ ) e foram mais intensas na fração extraída de plantas submetidas ao estresse salino (WILSON *et al.*, 2000; RECIO, 2003).

Ácidos urônicos e Rha, que são componentes das pectinas, além de Fuc também foram detectados. A ocorrência de Man e Glc poderia estar relacionada à presença de glucomananas, presentes nas folhas de ginko (*Ginkgo biloba*) (YANG; ZHOU; LIANG, 2009), salva (*Salvia officinalis*) (CAPEK, 2009), barba de barão (*Arum maculatum*) (KOLEVA; GIOREVA, 1986) e babosa (*Aloe vahombe*) (VILKAS; RADJABI-NASSAB, 1986). A Xyl poderia ser derivada de xilogalacturonanas, identificada nas folhas de caqui (*D. kaki*) (DUAN *et al.*, 2003).

O estresse salino promoveu aumento do conteúdo de ácidos urônicos e Glc na fração W, enquanto o conteúdo de Man e Xyl foi diminuído (FIGURA 17A). Células de tabaco (*N. tabacum*) submetidas ao estresse salino apresentaram aumento da extratibilidade de polissacarídeos ácidos, provavelmente por redução de suas interações com RGI (IRAKI *et al.*, 1989b). Assim, esta poderia ser uma resposta típica da parede celular ao estresse salino. A redução de Xyl pode estar relacionada a maiores ligações de xilogalacturonanas na parede celular em condições de estresse salino (SAULNIER; THIBAUT, 1999; BARAKAT *et al.*, 2007). E a redução da Man também pode estar relacionada à maior associação envolvendo glucomananas, que foram relatadas necessárias para manter a estrutura dos vasos transportadores de álamo (*P. tremula*) (KIM; DANIEL, 2012a).

O perfil de eluição por HPSEC da fração W está apresentado na FIGURA 17C. Na fração controle foram identificados três picos principais, eluindo em torno de 48, 52 e 58 min, sendo o último bem alargado, representando ampla faixa de massas moleculares. Durante o estresse salino, foi observado aumento da intensidade dos picos eluindo em torno de 48 e 52 min. Para a fração de menor massa molecular (maior tempo de eluição), houve deslocamento para tempos maiores de eluição e redução na polidispersão.

Durante o tratamento enzimático para remoção do amido da fração E não sobrou material suficiente para as análises químicas.

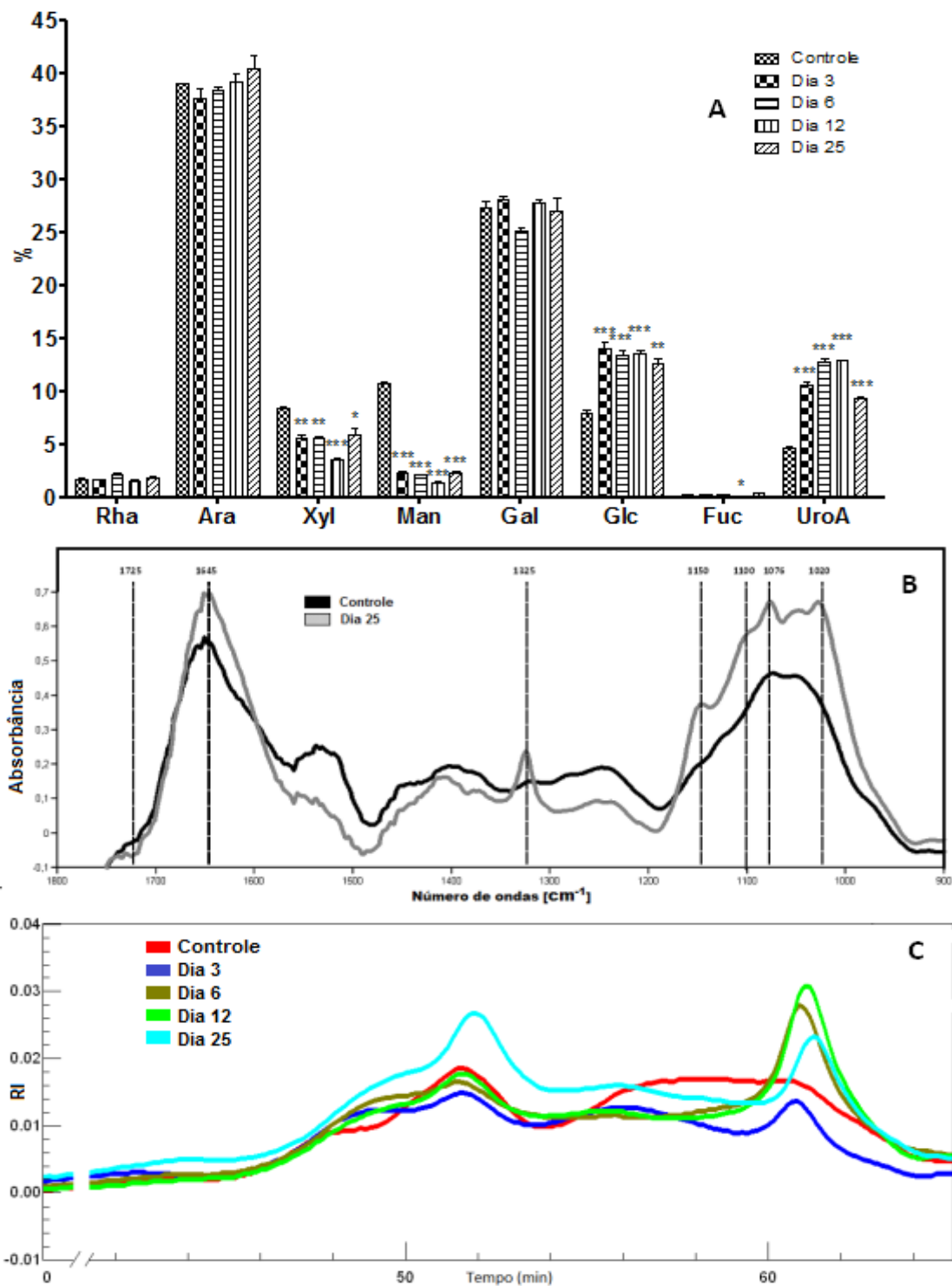


FIGURA 13- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (C) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO.

NOTA: Plantas irrigadas com solução nutritiva - Controle; Dia 3, 6, 12 e 25 correspondem a plantas irrigadas com 150 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl por 3, 6, 12 e 25 dias, respectivamente. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.2.3 Polissacarídeos das frações hemicelulósicas

A composição monossacarídica da fração hemicelulósica extraída a 30°C das plantas controle apresentou como principal monossacarídeo Ara, seguido por concentrações equivalentes de Xyl, Glc, e Gal sugerindo a presença de arabinoxilanas e arabinogalactanas (FIGURA 14A). A presença de Fuc nesta fração sugere que a Glc, assim como parte da Xyl e Gal sejam provenientes de xiloglucanas. A fração extraída a 70°C também apresentou Ara em elevada concentração, mas nesta, os ácidos urônicos foram o segundo componente mais abundante, provavelmente devido à presença de glucuronoxilanas. Glc, Gal e Xyl também foram detectados (FIGURA 16A). Resultados similares foram publicados para frações hemicelulósicas de folhas de café (*C. arabica*) (CECY; CORRÊA, 1984) e de *A. thaliana* (ZABLACKIS *et al.*, 1995).

Os espectros de FT-IR das frações H30 (FIGURA 14B) apresentaram bandas relacionadas a xilanas (1420  $\text{cm}^{-1}$ ), xiloglucanas (1162  $\text{cm}^{-1}$ ) e glucuronoxilanas (1162 e 1043  $\text{cm}^{-1}$ ) (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000).

Durante o estresse salino, a concentração de Xyl e ácidos urônicos aumentou na fração H30, enquanto a de Gal, Ara e a de Glc diminuíram. O espectro de infravermelho confirmou a presença e o aumento das bandas relacionadas às xilanas (1420, 1162 e 1043  $\text{cm}^{-1}$ ) de acordo com a referências citadas na literatura (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000; MARGA; GALLO; HASENSTEIN, 2003) (FIGURA 14B).



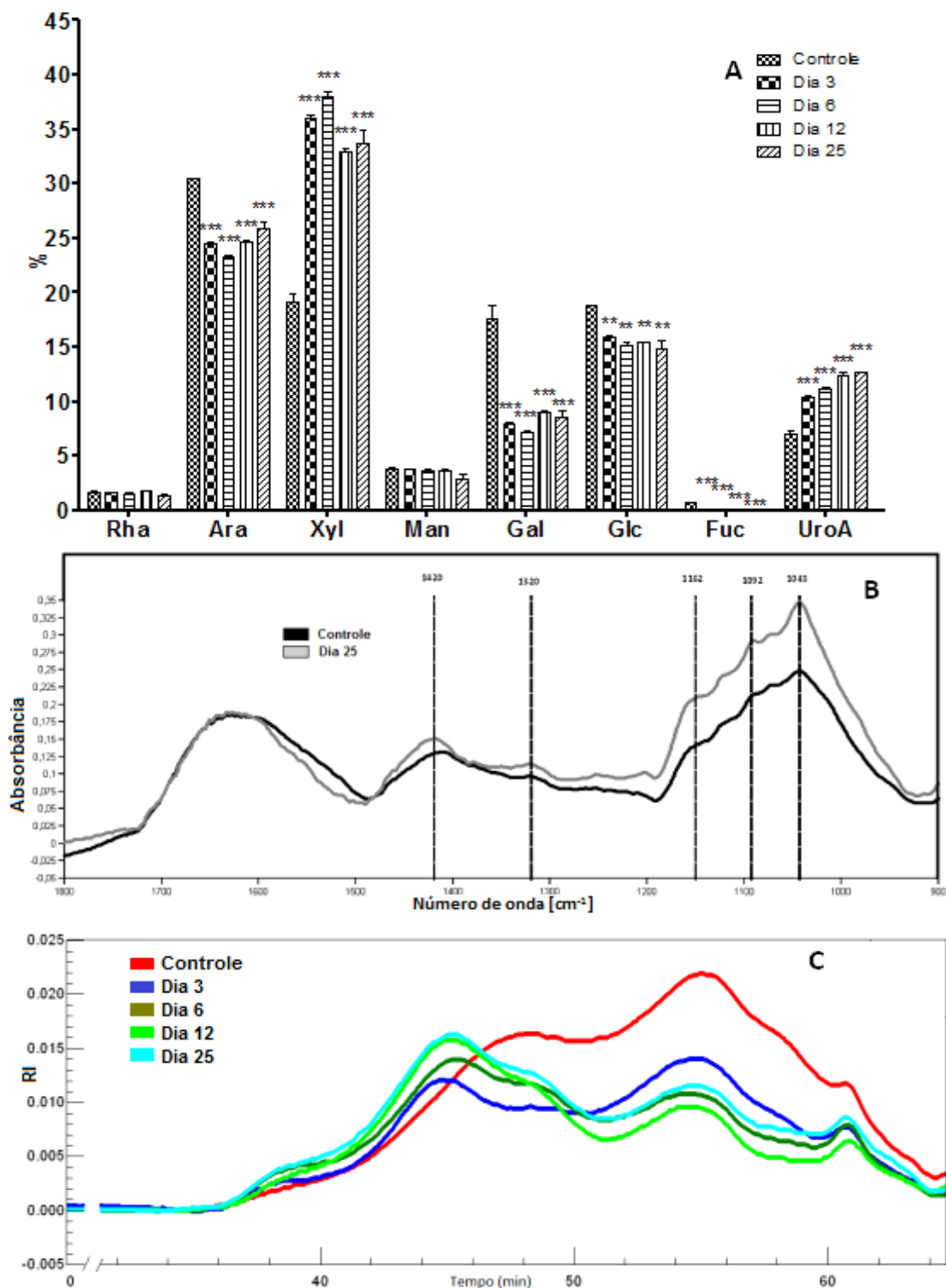


FIGURA 14- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A), ESPECTRO DE FT-IR (B) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (C) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO.

NOTA: Plantas irrigadas com solução nutritiva - Controle; Dia 3, 6, 12 e 25 correspondem a plantas irrigadas com 150 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl por 3, 6, 12 e 25 dias, respectivamente. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

O perfil de eluição por HPSEC das frações H30 controle e submetidas a estresse salino apresentou quatro picos principais (38, 47, 55 e 61 min) (FIGURA 14C). Durante o estresse salino, foi observado deslocamento dos picos para tempos de eluição menores sugerindo aumento da massa molecular dos polissacarídeos desta fração. O aumento do tamanho dos polissacarídeos está relacionado a enrijecimento da parede celular (LABAVITCH; RAY, 1974a; b; GILKES; HALL, 1977; MASUDA, 1990; COSGROVE, 1999), possivelmente por aumentar as interações entre os polissacarídeos (BAI; HU; XU, 2012).

Os espectros de RMN-<sup>13</sup>C das frações H30 controle e durante 25 dias de estresse salino (FIGURA 15) foram similares, no entanto, mudanças na intensidade de certos sinais foram observadas. Na região anomérica, sinais em  $\delta$  100,0; 101,6; 104,6 e 107,6 ppm podem ser atribuídos à  $\alpha$ -ácidos urônicos (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009);  $\beta$ -Xyl (ROUBROEKS; ANDERSSON; AMAN, 2000);  $\beta$ -Gal (CRUZ *et al.*, 2010; MATULOVÁ *et al.*, 2011),  $\alpha$ -Ara (MANDAL *et al.*, 2011), respectivamente.

Similarmente a fração H30, a fração H70 apresentou Ara e Xyl como principais monossacarídeos (FIGURA 16A). No entanto, foram observadas diferenças nas proporções dos monossacarídeos. Quando comparada a fração H30, a fração H70 apresentou maiores concentrações de Rha e ácidos urônicos, indicando maior extração de pectinas.

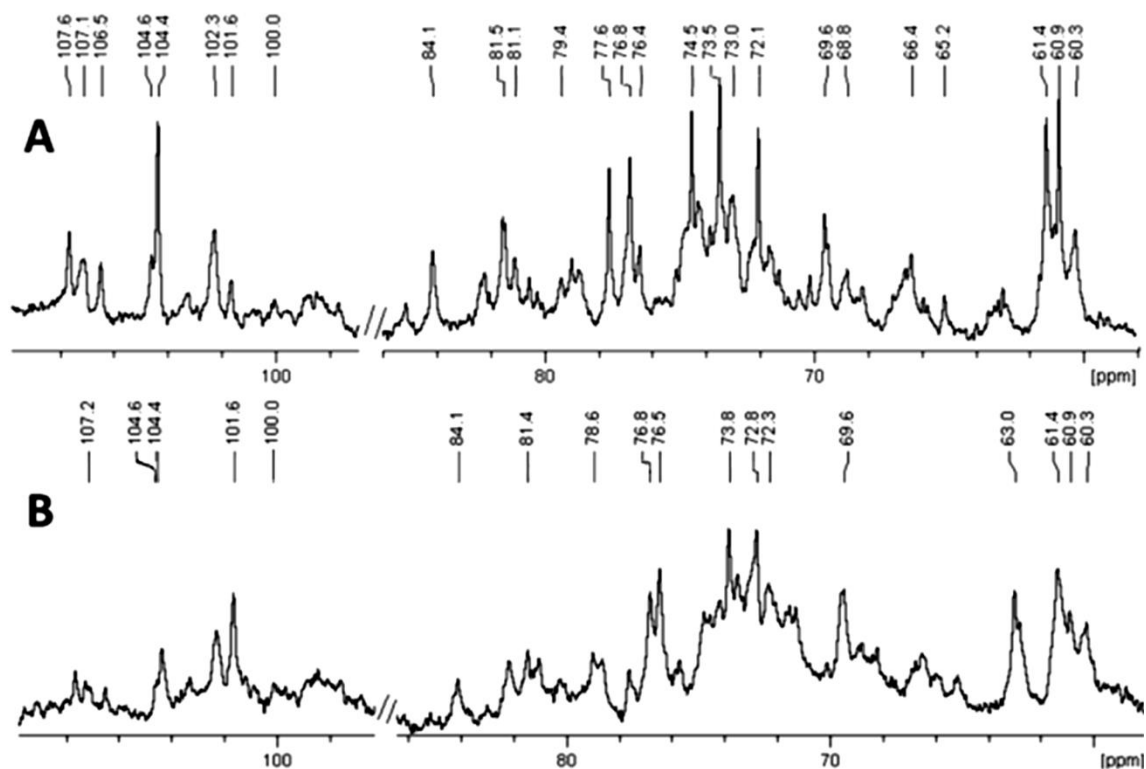


FIGURA 15 – ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM DE NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE *C. arabica* CONTROLE (A) E SUBMETIDAS A 25 DIAS DE ESTRESSE SALINO (B).

Em comparação ao controle, a fração H70 proveniente de plantas submetidas a estresse salino apresentou maior quantidade de Xyl e ácidos urônicos, enquanto o conteúdo de Ara e Gal diminuiu (FIGURA 16A).

O perfil de eluição por HPSEC da fração H70 controle apresentou três principais picos (em torno de 49, 56 e 61 min) (FIGURA 16B). Quando comparado ao controle, houve deslocamento dos picos eluindo em 51 e 61 min para tempos de eluição menores nas frações obtidas de plantas submetidas a estresse salino, sugerindo aumento da massa molecular. No entanto, para os polímeros maiores, que eluíram primeiro, houve deslocamento para tempos de eluição menores, sugerindo diminuição da massa molecular. Este efeito pode estar relacionado ao aumento de ROS causando a clivagem deste grupo de polímeros (SCHWEIKERT; LISZAKAY; SCHOPFER, 2002). O aumento nos tamanhos dos polissacarídeos menores nas frações extraídas durante o estresse corrobora a ideia de aumento das associações entre os polissacarídeos na parede celular.

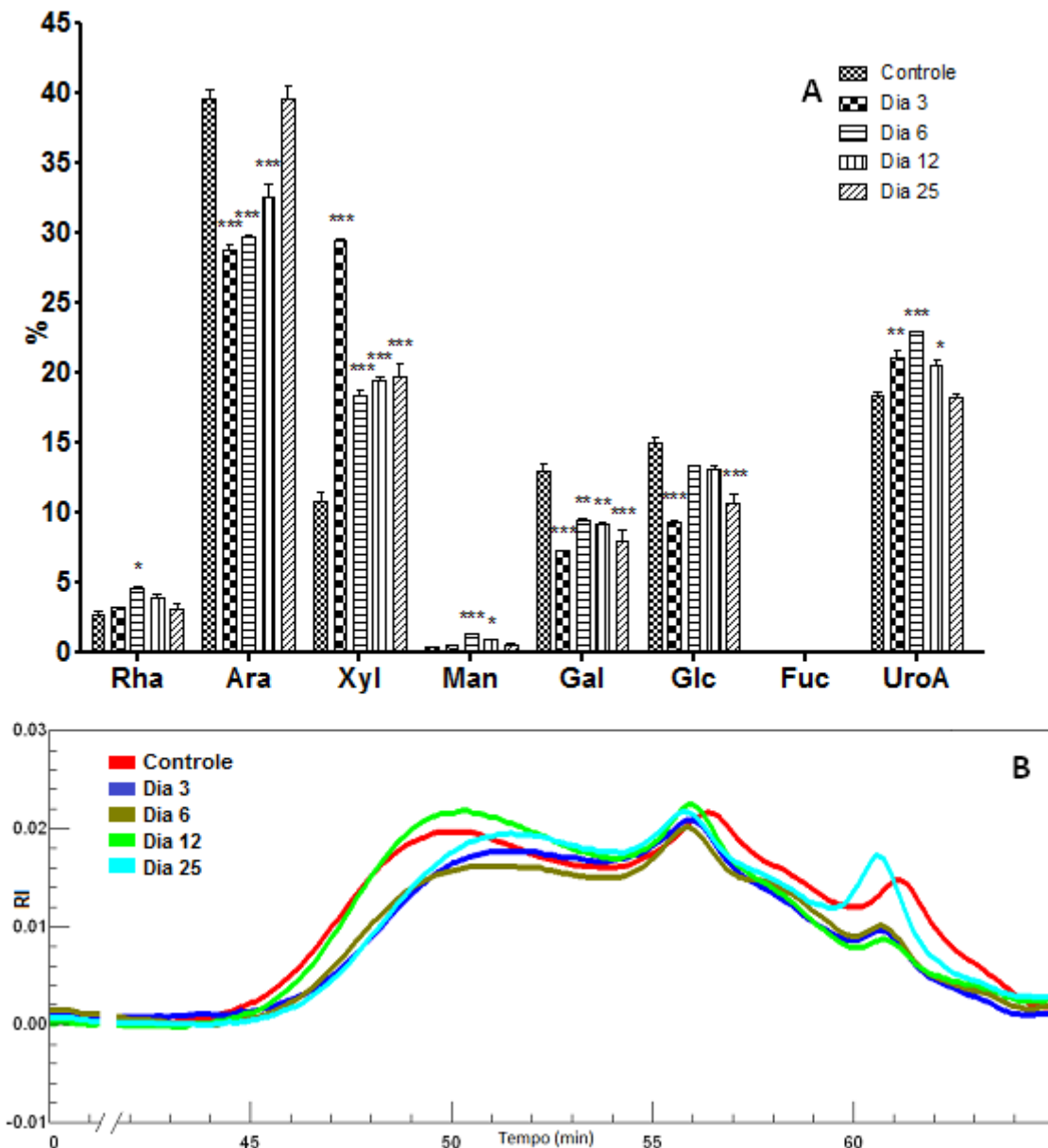


FIGURA 16- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (B) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO.

NOTA: Plantas irrigadas com solução nutritiva - Controle; Dia 3, 6, 12 e 25 correspondem a plantas irrigadas com 150 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl por 3, 6, 12 e 25 dias, respectivamente. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de aldito; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 5.2.4 Polissacarídeos e monolignóis da fração lignocelulósica

O resíduo final insolúvel apresentou como principal componente a Glc comprovando a presença de celulose nesta fração. Pequenas proporções dos monossacarídeos não celulósicos foram detectadas (FIGURA 17A). O estresse salino causou pequenas variações na proporção destes componentes.

A presença de parede secundária no material de estudo foi confirmada pelas análises de monolignóis da lignina no resíduo final insolúvel (FIGURA 21B). A composição dos monolignóis apresentou a forma G e S como principais tipos presentes na fração R, os quais ocorrem principalmente em angiospermas (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

Nas condições de estresse salino houve aumento da concentração das formas G e S. Este aumento no conteúdo de monolignol corrobora com os resultados obtidos de folhas de morango (*F. ananassa*) submetidas ao estresse térmico (GULEN; ERIS, 2004). A polimerização de lignina requer peroxidases ou lacases mais  $H_2O_2$  (MOURA *et al.*, 2010). O estresse salino foi relacionado como causa da produção de ROS e  $H_2O_2$  em plantas (SUZUKI; MITLLER, 2006; GORETA *et al.*, 2008; CHAWLA; JAIN; JAIN, 2012) e poderia gerar  $H_2O_2$  na folha de café estimulando a polimerização dos monolignóis.

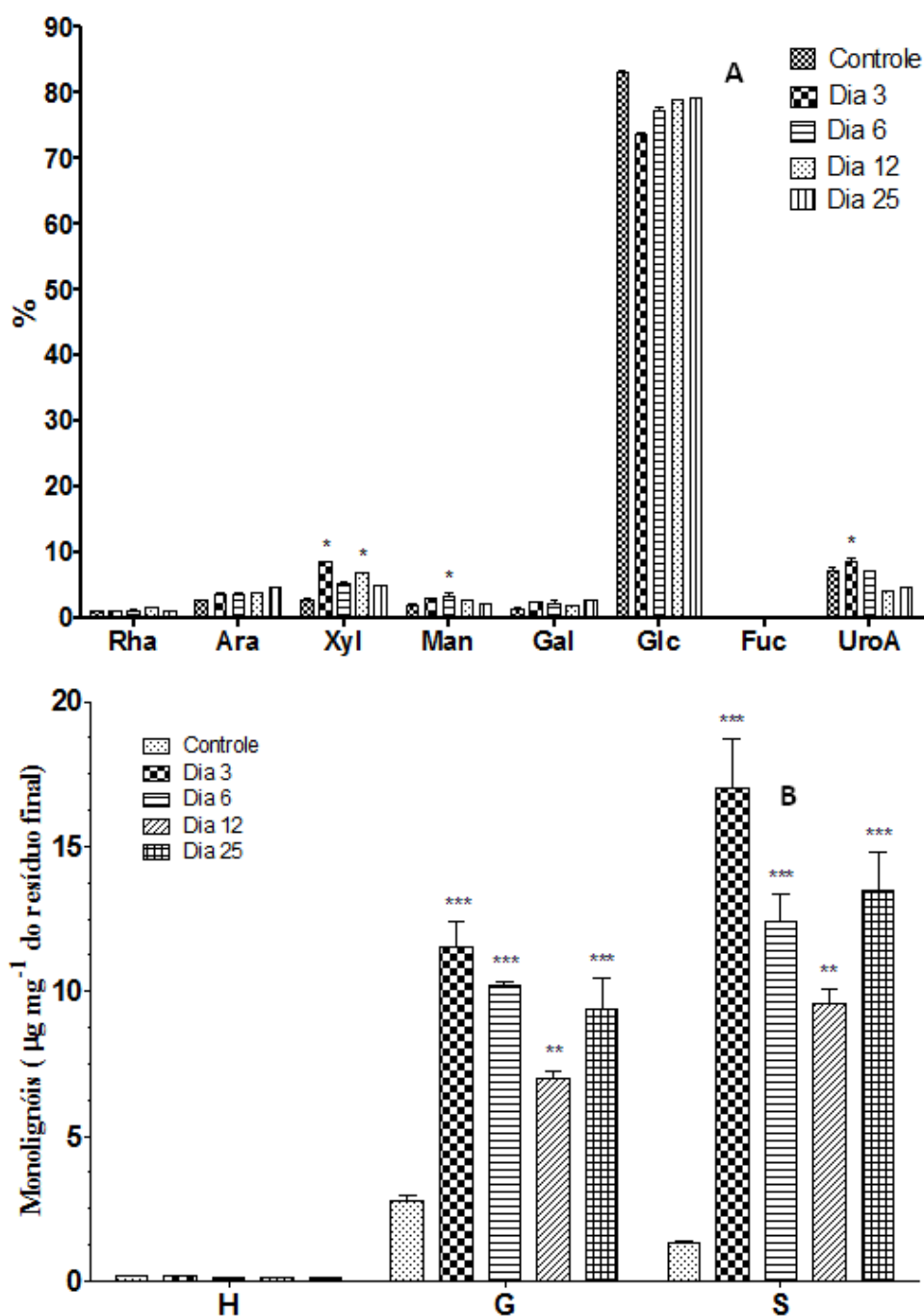


FIGURA 17- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E DOS MONOLIGNOIS (B) DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO.

NOTA: Plantas irrigadas com solução nutritiva - Controle; Dia 3, 6, 12 e 25 correspondem a plantas irrigadas com  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  NaCl por 3, 6, 12 e 25 dias, respectivamente. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Monolignóis na forma aldeídica determinados por HPLC. Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.2.5 Microscopia óptica e eletrônica

O mesofilo foliar de *C. arabica* é organizado como uma única camada de células alongadas do parênquima paliçádico e menor proporção de células do parênquima esponjoso com formato irregular, que permitem a circulação de gases nos espaços intercelulares (FIGURA 18A e C). Durante vinte e cinco dias de estresse, o parênquima paliçádico apresentou-se mais espaçados e com células mais finas em relação ao controle. Conseqüentemente, a espessura total da folha foi também diminuída (FIGURA 18B e D).

Diferenças na ultraestrutura foram detectadas entre o grupo controle e as folhas provenientes de plantas submetidas ao estresse salino (FIGURA 19). As células do mesofilo revelaram que os cloroplastos das células de plantas controle possuíam forma elipsoidal com sistemas de membranas bem desenvolvidos compostos de grana e estroma com amido; as membranas dos cloroplastos estavam intactas e sem danos (FIGURA 19A e C). Os tilacoides do grana e do estroma estão ordenados e bem densos e alguns plastoglóbulo foram observados no controle. Porém, durante o estresse salino, os tilacoides apresentam-se levemente inchados e altamente desorganizados, além de apresentar decréscimo do amido (FIGURA 19B e D). Estes efeitos foram observados em folhas de arroz (*O. sativa*) submetidas ao estresse térmico (ZHANG *et al.*, 2009b) e a senescência (ZHANG *et al.*, 2010b) e em folhas de soja submetidas ao estresse térmico (ZHANG *et al.*, 2009a; ZHANG *et al.*, 2010b; DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2011).

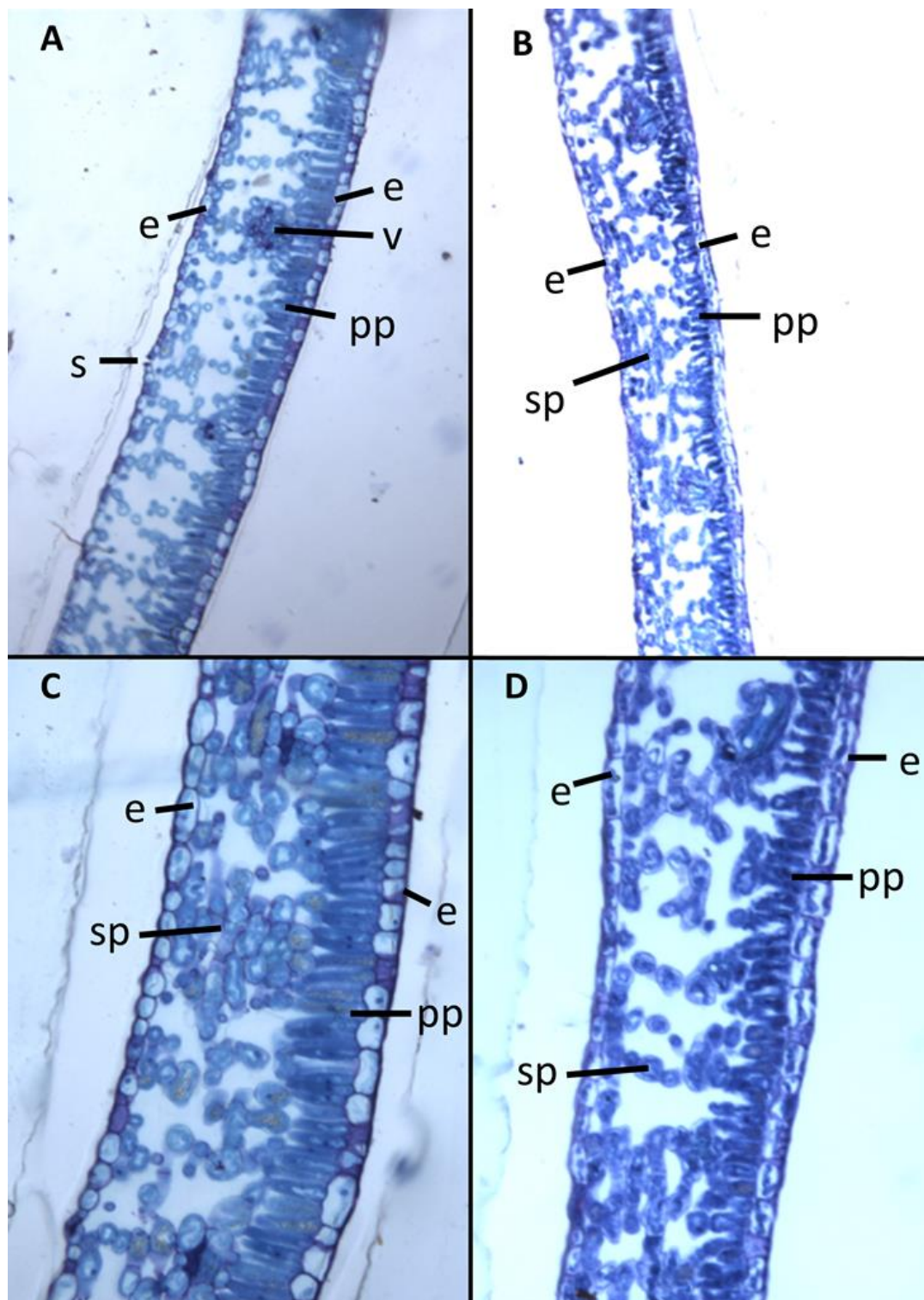


FIGURA 18- ESTRUTURAS MICROSCÓPICAS DAS FOLHAS DE *C. arabica*: CONTROLE (100x) (A); 25 DIAS DE ESTRESSE SALINO (100x) (B); CONTROLE (200x) (C); E 25 DIAS DE ESTRESSE (200x) (D)

NOTA: Epiderme (e); Vasos (xilema e floema) (v); Parênquima Esponjoso (sp); Parênquima Paliçádico (pp); Estômato (s). Coloração com azul de toluidina 0,05%.



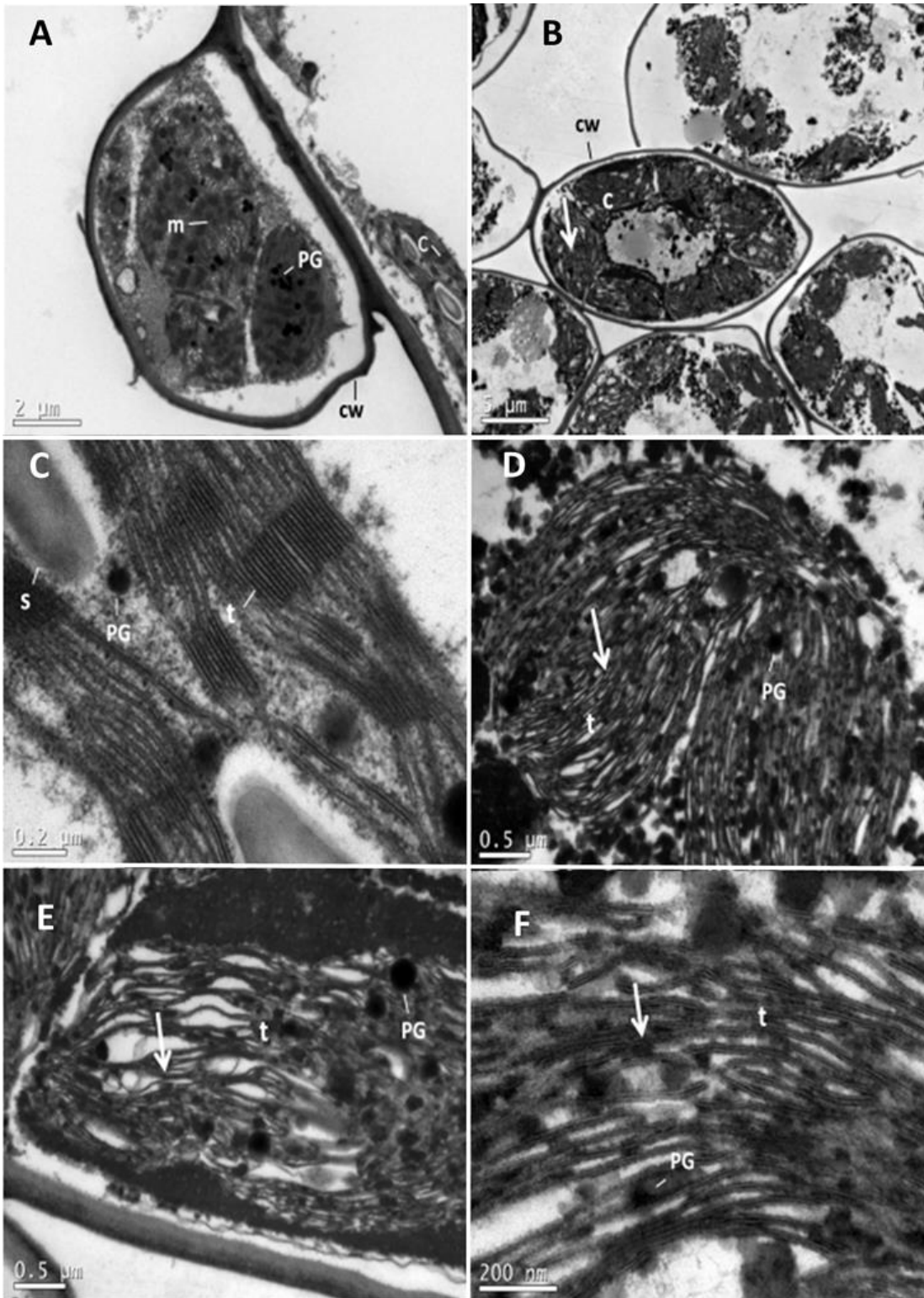


FIGURA 19- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE *C. arabica*. CÉLULAS CONTROLE (A); CÉLULAS SUBMETIDAS A 25 DIAS DE ESTRESSE SALINO (B); CLOROPLASTOS CONTROLE (C); E CLOROPLASTOS DE CÉLULAS SUBMETIDAS A 25 DIAS DE ESTRESSE SALINO (D-F).

NOTA: Parede Celular (CW); Mitocôndria (M); Plastoglóbulo (PG); Cloroplastos (C); Tilacoides (T); E Amido (S).

## 5.3 ESTRESSE HÍDRICO

### 5.3.1 Rendimento das frações de polissacarídeos

As plantas de *C. arabica* submetidas ao estresse hídrico tinham 18 meses e cerca de 70 cm de altura. Os rendimentos das frações hemicelulósicas (H30 e H70) e celulósica foram similares enquanto as frações pécticas apresentaram menores rendimentos (TABELA 3).

Durante o estresse hídrico o rendimento das frações pécticas e hemicelulósicas foi aumentado, sugerindo que o estresse hídrico diminuiu as interações entre os polissacarídeos da parede celular. Resultados semelhantes foram obtidos em culturas de células adaptadas ao estresse salino e osmótico (IRAKI *et al.*, 1989b). O aumento da solubilização de pectinas e hemiceluloses são respostas típicas do relaxamento da parede celular em resposta ao crescimento celular (COSGROVE, 1999; PAULY *et al.*, 2000; THOMPSON, 2005). A redução do enrijecimento da parede celular foi relatada em coleótilos de trigo (*T. aestivum*) (WAKABAYASHI; HOSON; KAMISAKA, 1997), folhas de milho (*Z. mays*) (ACEVEDO; HSIAO; HENDERSON, 1971), hipocótilo de abóbora (*Cucurbita maxima*) (SAKURAI; TANAKA; KURAISHI, 1987a; c), em folhas de uva (*Vitis vinifera*) (SWEET *et al.*, 1990) em condições de estresse hídrico.

TABELA 3- RENDIMENTO (EM %<sup>a</sup>) DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

Tratamento/Fração	PECTINAS		HEMICELULOSES		CELULOSE
	W (%)	E (%)	H30 (%)	H70 (%)	R (%)
Controle	2,8	1,6	11,6	7,4	15,0
Moderado	4,2	3,3	12,2	3,2	12,0
Severo	3,3	4,8	21,1	3,7	12,2

<sup>a</sup> Em relação as folhas desclorofiladas e livres de carboidratos de baixa massa

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa.

Para a fração celulósica, observou-se discreta redução do rendimento com o estresse hídrico (TABELA 3). Resultados semelhantes foram obtidos em raízes de cultivares de trigo (*T. aestivum*) (KONNO *et al.*, 2008) e em células de tabaco (*N. tabacum*) (IRAKI *et al.*, 1989a) submetidas ao estresse hídrico.

Durante o tratamento enzimático para remoção do amido o rendimento das frações pécticas foi muito baixo, impossibilitando as análises das frações W e E.

### 5.3.2 Polissacarídeos das frações hemicelulósicas

A composição monossacarídica das frações hemicelulósicas das folhas de plantas de café utilizadas para avaliação dos efeitos do estresse hídrico (FIGURA 20A e 14A) foi semelhante à descrita anteriormente para as plantas utilizadas para estudo do estresse térmico. Os resultados sugerem a presença de arabinoxilanas e glucuronoxilanas. Resultados semelhantes foram descritos para *C. arabica* L. var Mundo Novo (WENZEL; CORRÊA, 1977; CECY; CORRÊA, 1984).

Durante o estresse hídrico foram observadas poucas alterações na fração H30. Na condição de estresse moderado, a concentração de Xyl aumentou levemente, enquanto a de Glc e a de Man diminuíram. Estas alterações podem estar relacionadas à solubilidade aumentada de arabinoxilanas que estão envolvidas no uso eficiente da água pelas plantas (ZHANG *et al.*, 2010a) e a redução da solubilidade de glucomanas relacionadas à maior flexibilidade da parede celular nos tecidos vegetais (KIM; DANIEL, 2012a). No estresse severo observou-se aumento do conteúdo de Gal e Fuc (FIGURA 20A).

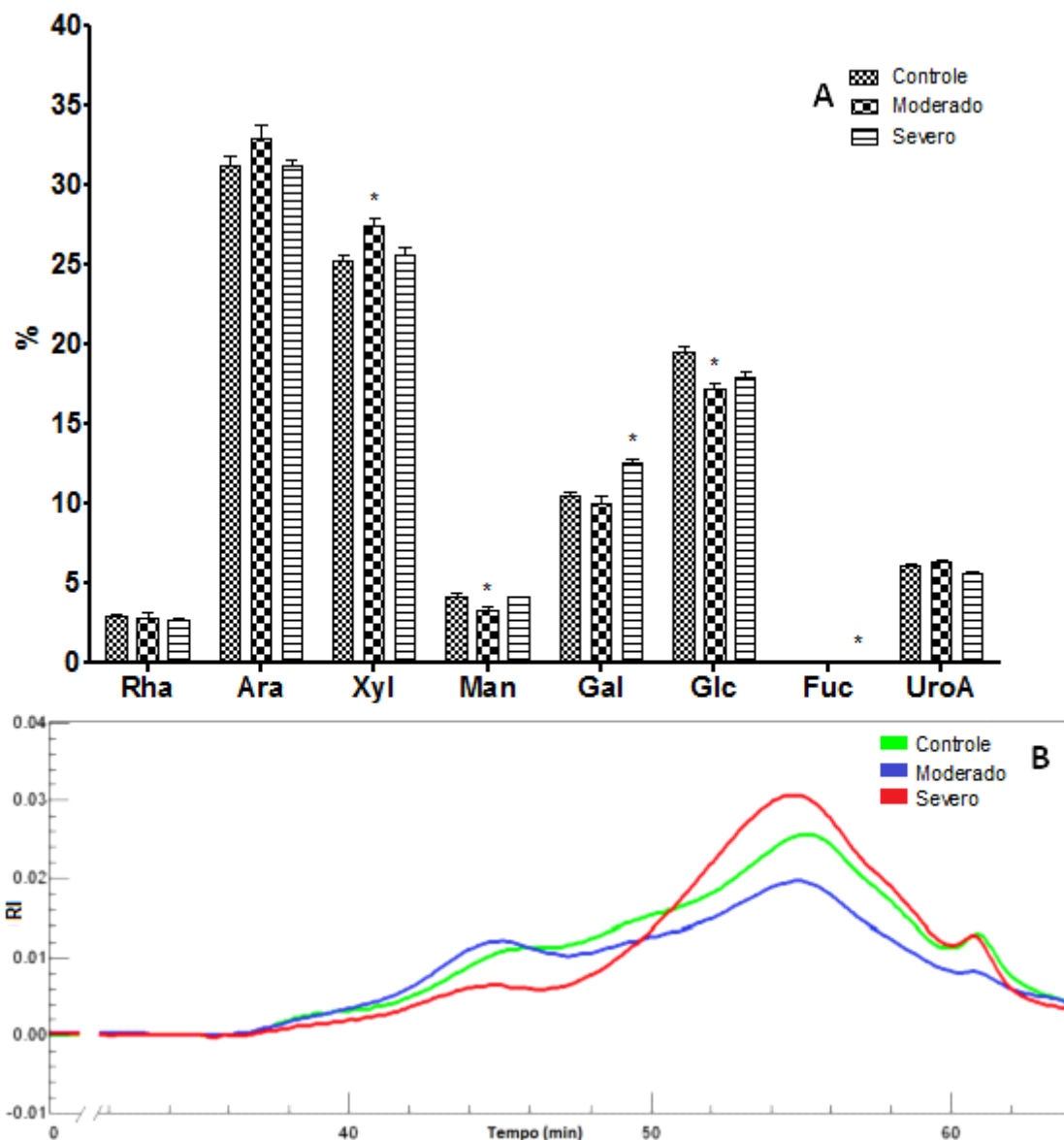


FIGURA 20- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (B) DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , E \*\*\* $p < 0,001$ .

O perfil de eluição por HPSEC das frações H30 controle e das plantas submetidas ao estresse hídrico apresentou três picos principais (44, 55 e 61 min) (FIGURA 20B). Durante o estresse hídrico foram detectadas alterações nas amplitudes destes picos em comparação ao controle. Para a fração H30 proveniente de plantas submetidas a estresse severo, os resultados sugerem

diminuição da concentração dos polissacarídeos maiores e aumento da concentração da fração que elui em torno de 55 min.

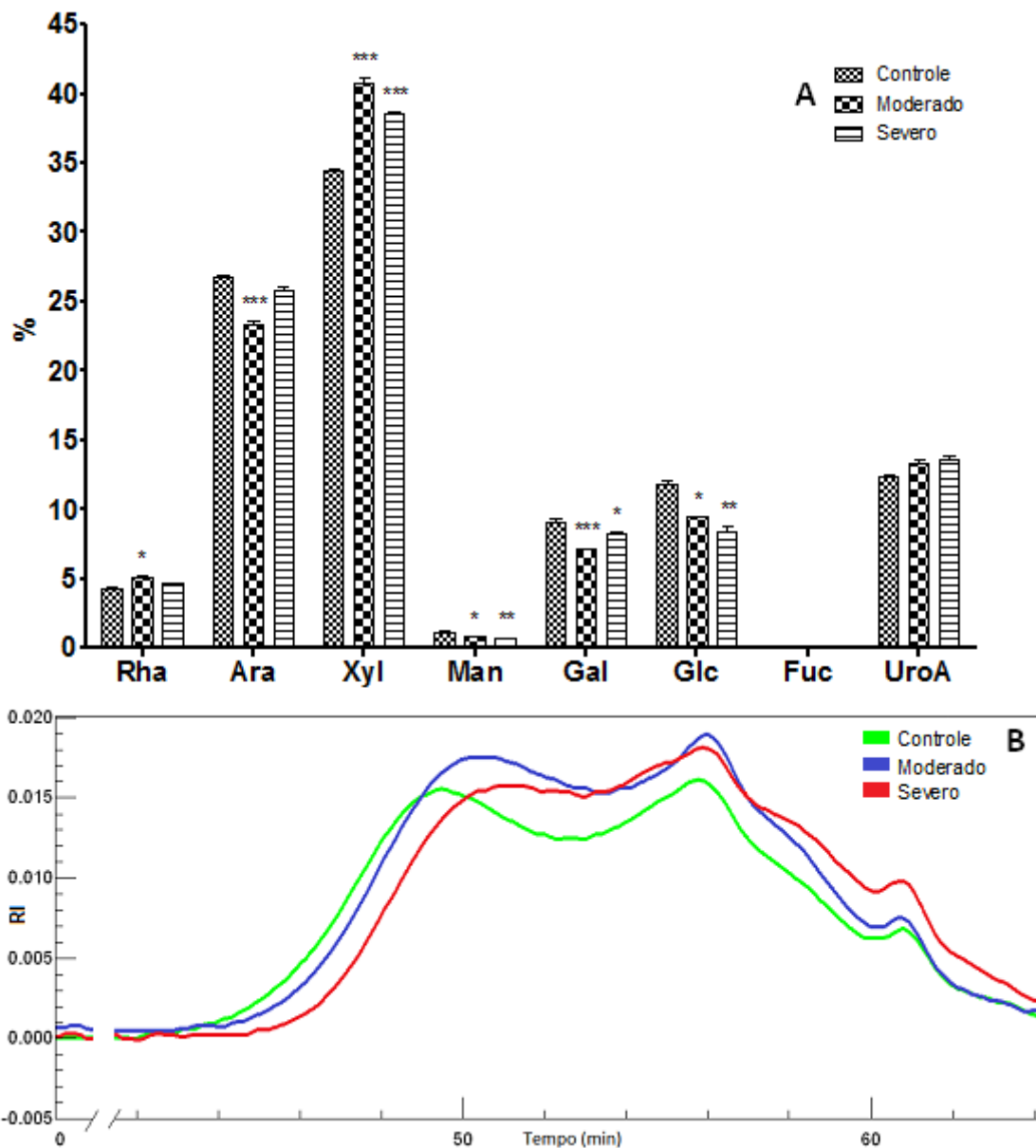


FIGURA 21- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI (B) DOS POLISSACARÍDEO EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo:-4,5 MPa. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol, e ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Em comparação ao controle, as frações H70 isoladas de plantas submetidas ao estresse hídrico apresentaram maior quantidade de Xyl, enquanto o conteúdo de Ara, Glc, Gal e Man diminuiu. Porém, não houve diferenças no conteúdo de ácidos urônicos (FIGURA 21A). O aumento observado no teor de Xyl associado ao decréscimo no conteúdo de Ara poderia estar relacionado a mudanças nas ligações cruzadas de cadeia principais de glucuronoarabinoxilanas com fibras de celulose (URAHARA *et al.*, 2004).

O perfil de eluição por HPSEC das frações H70 apresentou três picos principais (49, 55 e 61min). Durante o estresse hídrico, os picos eluindo em 49 e 55 min foram deslocados para tempos de eluição maiores, indicando redução da massa molecular dos polissacarídeos extraídos (FIGURA 21B). A redução do tamanho de polissacarídeos é descrita como principal efeito do afrouxamento da parede celular (REIS; VIAN; ROLAND, 1994; WHITNEY *et al.*, 1999; PAULY *et al.*, 2000; BOURQUIN *et al.*, 2002).

### 5.3.3 Polissacarídeos e monolignóis da fração lignocelulósica

Além da Glc, o resíduo final insolúvel apresentou quantidades elevadas de Xyl e os outros monossacarídeos em menores concentrações (FIGURA 15A) indicando forte associação dos polissacarídeos não celulósicos a celulose nas folhas maduras de café.

Durante o estresse houve pequeno aumento do conteúdo de ácido urônico (FIGURA 22A). Tal resposta no resíduo final pode estar relacionada a interações mais fortes no resíduo lignocelulósico com glucuronoxilanas (IMAMURA *et al.*, 1994) em condições de estresse hídrico.

A composição dos monolignóis do resíduo final do estresse hídrico não apresentou alterações em relação ao controle para os monolignóis G e S e para o monolignol H apenas leve redução foi observada (FIGURA 22B). Desse modo, em condições de estresse hídrico, *C. arabica* não altera a concentração de lignina da parede celular. Como a lignina esta diretamente relacionada ao enrijecimento da parede celular, este resultado corrobora a hipótese

apresentada de que o estresse hídrico não causa enrijecimento da parede celular.

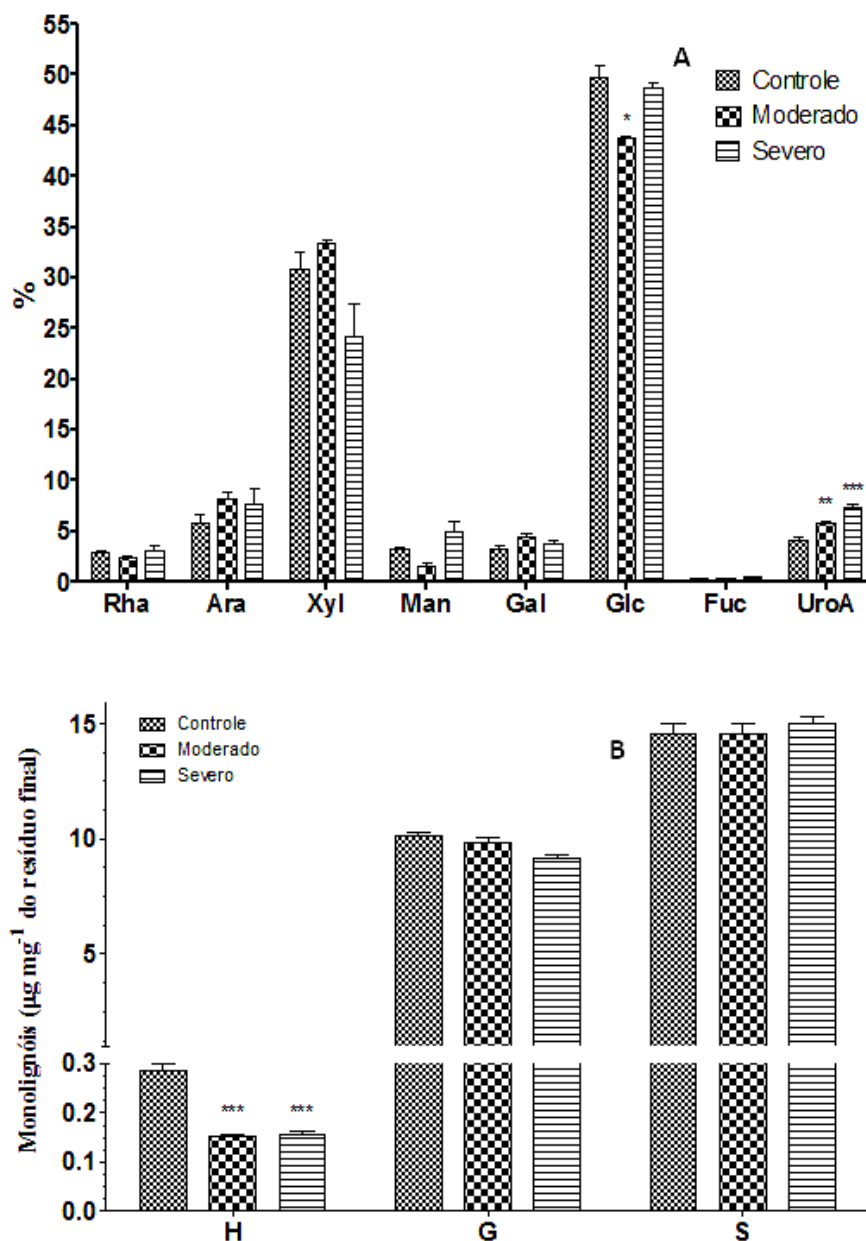


FIGURA 22- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (A) E DOS MONOLIGNOIS (B) DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE *C. arabica* SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Monolignóis na forma aldeídica determinados por HPLC. Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão das células do mesofilo submetidas ao estresse hídrico demonstra claramente redução do conteúdo de amido dos cloroplastos e leve disrupção dos sistemas de membranas dos tilacoides dos cloroplastos (FIGURA 23). Efeitos semelhantes foram obtidos em folhas de lírio em condições de estresse hídrico (ZHANG *et al.*, 2011). Este resultado pode estar relacionado às necessidades aumentadas de energia em resposta ao estresse hídrico (CAVATTE *et al.*, 2012).

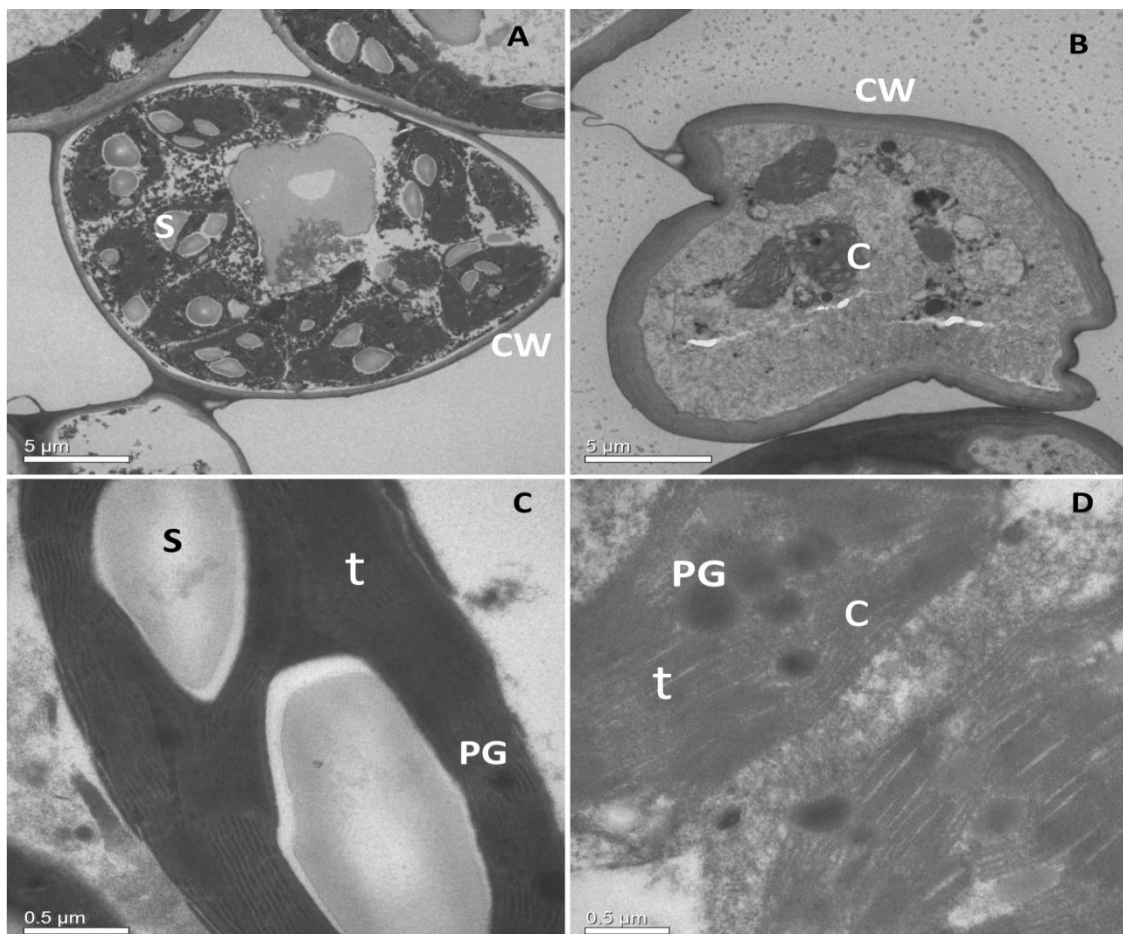


FIGURA 23- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE *C. arabica*. CÉLULAS CONTROLE (A); CÉLULAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE SEVERO (B); CLOROPLASTOS CONTROLE (C); E CLOROPLASTOS DE CÉLULAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE SEVERO.

NOTA: Parede Celular (CW); Plastoglóbulo (PG); Cloroplastos (C); Tilacoides (T); E Amido (S).



#### 5.4 CLONES 14 E 109A DE *C. Canephora*

Plantas de *C. canephora*, também chamada de café robusta, normalmente apresentam mais tolerância ao estresse hídrico. Cruzamentos entre suas variedades geraram os clones tolerante (clone 14) e sensível (clone 109A) ao estresse hídrico (DAMATTA *et al.*, 2003). Investigações das características que garantem a tolerância do clone 14 foram realizadas (PINHEIRO *et al.*, 2004; MIRNA HILAL, 2007; PRIVAT *et al.*, 2008; MONDEGO *et al.*, 2011), mas não há informações acerca das alterações na parede celular. Um dos objetivos desse trabalho foi comparar as alterações na parede celular de ambos os clones submetidos ao estresse hídrico e indicar as características da parede celular do clone tolerante que podem estar relacionadas a essa tolerância.

##### 5.4.1 Quantificação dos RFOs

Muitos autores (SARAVITZ; PHARR; CARTER-JR., 1987; KUO; VANMIDDLESWORTH; WOLF, 1988; LOWELL; KUO, 1989) sugerem que os RFO, principalmente rafinose e estaquiose, estão relacionados com o processo de tolerância ao estresse osmótico, promovendo a formação de um estado vítreo que protege as macromoléculas (LEOPOLD; SUN; BERNAL-LUGO, 1994; SPRENGER; KELLER, 2000; PENNYCOOKE; JONES; STUSHNOFF, 2003; MOORE, 2006; MOORE *et al.*, 2007; SANTOS, 2008b). Castillo *et al.* (1990), sugeriram que RFO podem, também, fornecer microambiente de água e de grupos hidroxílicos, protegendo proteínas de membrana e outras moléculas biologicamente ativas da desnaturação durante o processo de dessecação das sementes.

Santos *et al.* (2011), no IAPAR, verificaram que folhas de *C. arabica* submetidas aos estresses hídrico, salino e térmico apresentaram alterações na composição dos RFOs. Estes resultados estimularam o presente trabalho na avaliação dos RFOs nos clones sensível e tolerante ao estresse hídrico de *C.*

*canephora*. Os resultados destas análises serão comparados às mudanças no padrão de expressão das enzimas relacionadas à síntese dos RFO em condições de estresse em trabalho de doutorado que está sendo desenvolvido no IAPAR.

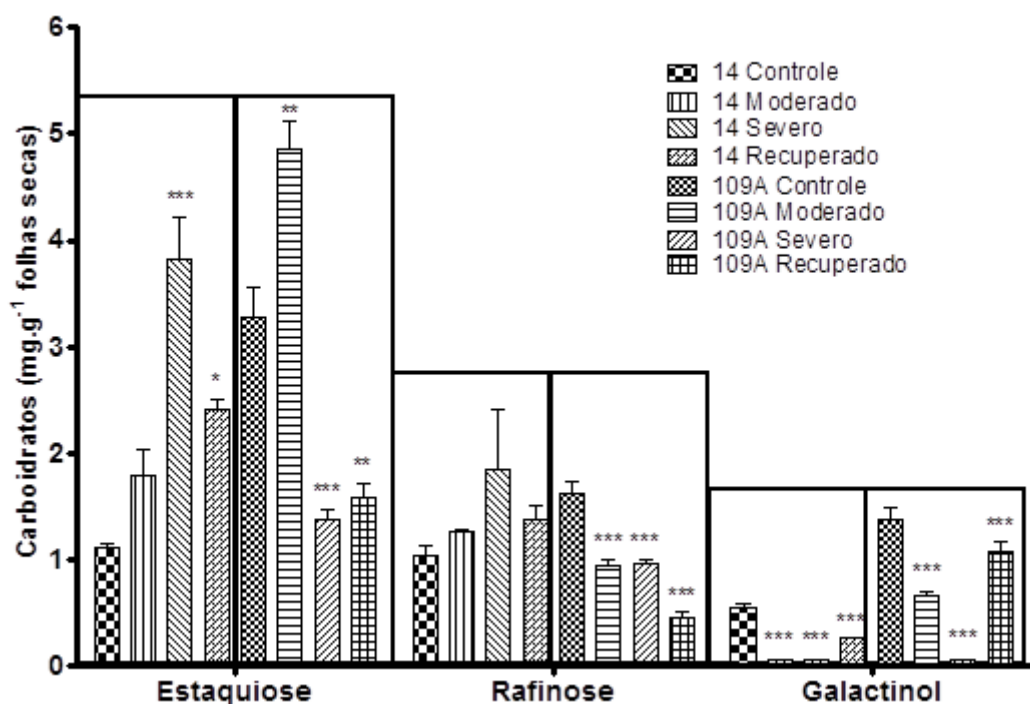


FIGURA 24- QUANTIFICAÇÃO DOS RFOs DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) E SENSÍVEL (CLONE 109A) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 Mpa; Severo: -4,5 Mpa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo. Oligossacarídeos determinados por HPLC. Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

As quantidades dos oligossacarídeos avaliados (estaquiase, rafinose e galactinol) sofreram alterações em condições de estresse hídrico nos clones de *C. canephora* (FIGURA 24). No clone tolerante (14) a concentração de estaquiase aumentou significativamente e a de rafinose apresentou a mesma tendência, enquanto o conteúdo de galactinol diminuiu. No clone sensível (109A) todas as concentrações dos oligossacarídeos da família da rafinose foram diminuídas no estresse hídrico, exceto a concentração de estaquiase no estresse moderado. Assim, a alta suscetibilidade do clone sensível ao estresse

hídrico pode estar associada ao baixo controle osmótico, enquanto que o clone tolerante se reajusta melhor em condições de estresse hídrico (FIGURA 24).

#### 5.4.2 Rendimento das frações de polissacarídeos

As plantas de *C. canephora*, clone 14 e 109A (tolerante e sensível ao estresse hídrico, respectivamente) submetidas ao estresse hídrico tinham 18 meses de idade e cerca de 70 cm de altura. As folhas destas plantas foram submetidas a extrações sequenciais para isolamento de pectinas, hemiceluloses e celulose de acordo com o esquema da FIGURA 6. Previamente as extrações, o material vegetal foi submetido a tratamento enzimático para remoção de amido. Os rendimentos das frações polissacarídicas obtidas estão dispostos na TABELA 4.

TABELA 4- RENDIMENTO (EM %<sup>a</sup>) DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) E SENSÍVEL (CLONE 109A) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

Clone/ Tratamento	PECTINAS				HEMICELULOSES				CELULOSE	
	W (%)		E (%)		H30 (%)		H70 (%)		R (%)	
	14	109A	14	109A	14	109A	14	109A	14	109A
Controle	2,9	3,3	0,6	2,6	25,2	15,4	11,7	13,8	23,2	26,7
Moderado	2,0	3,2	0,5	3,1	20,3	15,8	13,7	14,9	26,6	29,1
Severo	2,5	7,1	0,4	2,6	23,4	21,6	16,5	11,3	24,9	32,6
Recuperado	2,8	12,5	0,4	5,6	25,6	22,9	13,8	15,0	20,4	21,5

<sup>a</sup> Em relação as folhas desclorofiladas e livres de carboidratos de baixa massa  
 NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo.

A fração controle do clone tolerante apresentou menor solubilização de pectinas e maior solubilização de hemiceluloses comparadas à fração controle

do clone sensível (TABELA 4). Por solubilizar grande quantidade de hemicelulose o clone sensível apresentou menor rendimento no resíduo final comparado ao clone sensível. Resultados semelhantes foram obtidos para raízes de trigo (*T. aestivum* e *T. durum*) tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico (KONNO *et al.*, 2008; LEUCCI *et al.*, 2008) e em células de tabaco (*N. tabacum*) tolerantes ao estresse hídrico (IRAKI *et al.*, 1989a), que apresentaram menores proporções de celulose e aumento da solubilização de hemiceluloses. Estes resultados sugerem que há associações mais fortes entre as pectinas e os polímeros da parede celular na espécie tolerante de *C. canephora* comparado a sensível ao estresse hídrico.

Durante o estresse hídrico foram verificadas importantes diferenças no rendimento das frações isoladas dos dois clones. A solubilização das frações pecticas no clone tolerante foi levemente diminuída, mas retornou ao valor do controle durante o período de recuperação. Por outro lado, o clone sensível, que já apresentava maior solubilização de pectinas, durante o estresse hídrico aumentou ainda mais o rendimento desta fração, mesmo durante a recuperação das plantas (TABELA 4). Resultados semelhantes foram obtidos em raízes de trigo (*T. aestivum*) tolerantes ao estresse hídrico (KONNO *et al.*, 2008) e em folhas de abeto (*Picea glauca*) (ZWIAZEK, 1991) e foram correlacionados a maiores interações entre os polissacarídeos da matriz da parede celular (LEUCCI *et al.*, 2008). As interações mais fortes entre os polímeros poderiam contribuir para o enrijecimento da parede celular, contribuindo para a maior resistência ao estresse hídrico.

Os rendimentos das frações hemicelulósicas reforçam a hipótese de maiores associações dos polímeros na parede celular do clone tolerante. Durante o estresse hídrico, no clone tolerante observou-se redução da extração de hemiceluloses a 30°C e aumento na extração a 70°C. Por outro lado, no clone sensível, houve aumento da extração de hemiceluloses nas duas condições de extração. Resultados semelhantes foram obtidos em culturas de células de tabaco (*N. tabacum*) adaptadas aos estresses salinos e hídricos (TERRY; JONES, 1981). Enquanto, Leucci *et al.* (2008) verificaram em raízes de trigo (*T. durum*) tolerante ao estresse hídrico diminuição do rendimento de hemiceluloses durante o estresse hídrico. Efeitos opostos foram relatados no crescimento celular, no qual há afrouxamento da parede celular com a

solubilização aumentada de hemiceluloses (FRY, 1980), corroborando com a hipótese de enrijecimento nas paredes celulares do clone tolerante.

#### 5.4.3 Polissacarídeos das frações pécticas

Os polissacarídeos ácidos foram mais abundantes na fração W controle do clone tolerante (FIGURA 25A) do que no clone sensível (FIGURA 25B). Adicionalmente, o estresse hídrico promoveu aumento da solubilização de polissacarídeos ácidos no clone tolerante, enquanto no clone sensível houve redução. O maior conteúdo de ácidos urônicos no clone tolerante pode ser uma característica que conferem maior tolerância ao estresse hídrico, visto que o comportamento é semelhante ao relatado em células em cultura de tabaco (*N. tabacum*) tolerantes ao estresse hídrico (IRAKI *et al.*, 1989b).

A elevada concentração de Glc na fração W em ambos os clones indica a presença de amido mesmo com o tratamento enzimático prévio, confirmado pelo o que foi confirmado com teste do iodo. O clone sensível apresentou maior concentração de amido em comparação ao clone tolerante e em ambos os clones o estresse hídrico diminuiu o conteúdo de amido (FIGURA 25 A e B).

Ambos os clones quando submetidos a estresse hídrico apresentaram aumento da solubilização de polissacarídeos contendo Ara e Gal, podendo estar relacionado à presença de arabinogalactanas, as quais foram extraídas com água quente de folhas de eudicotiledôneas (DUAN *et al.*, 2004) e em grãos de café (*C. arabica*) (CAPEK *et al.*, 2010). O espectro de FT-IR da fração W confirmou a presença arabinogalactanas do tipo II (FIGURA 26A e B), indicadas pelas bandas correspondentes de 1078, 1045  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas em 1150, 1100 e 1020  $\text{cm}^{-1}$  referente aos ácidos urônicos das pectinas (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000) também foram identificadas. Adicionalmente, o espectro de FT-IR desta fração apresentou bandas entre 1600 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem a proteínas (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 1999).

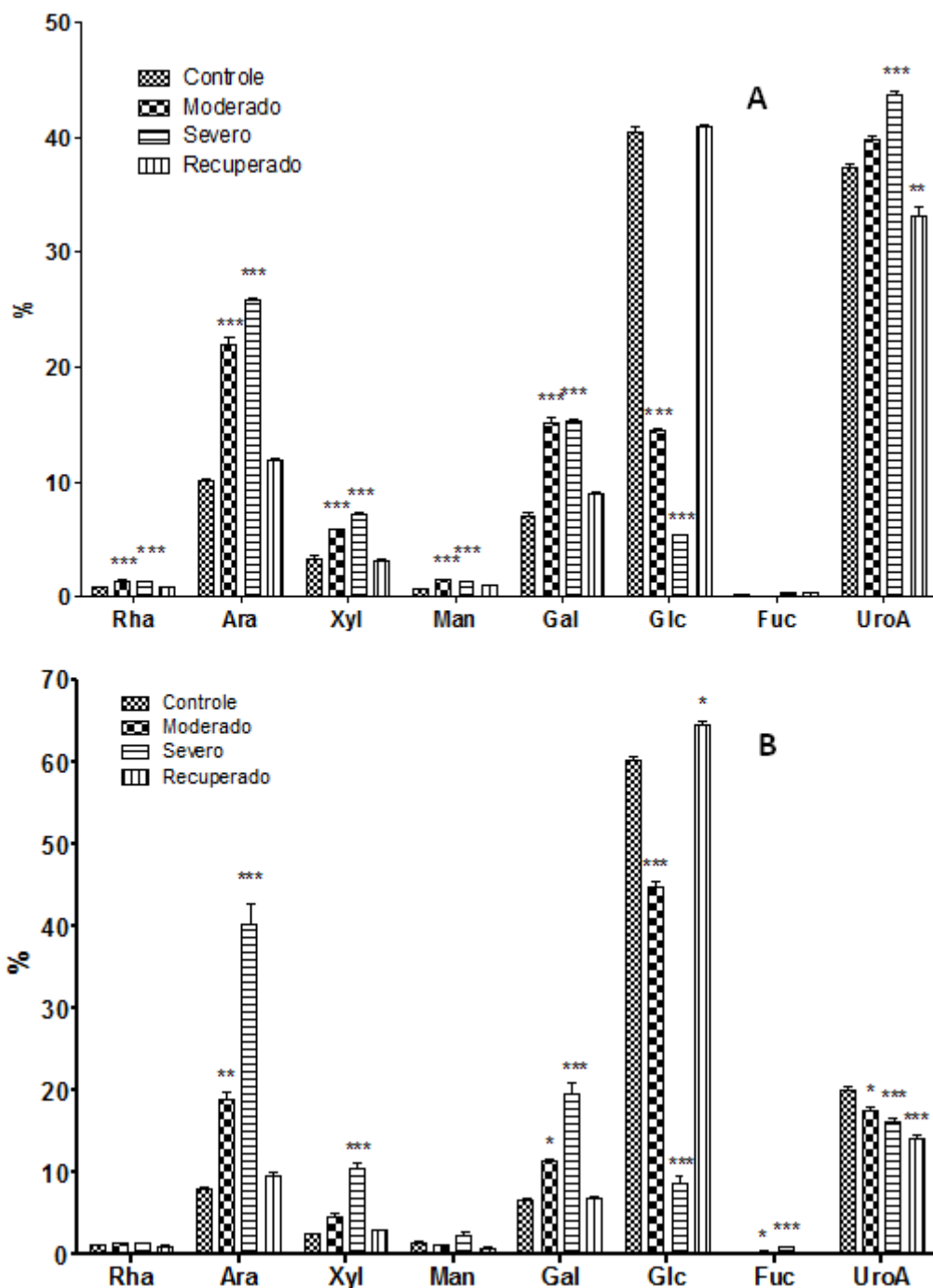


FIGURA 25- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Monolignóis na forma aldeídica determinados por HPLC. Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Durante o estresse hídrico o clone tolerante apresentou menor solubilização de arabinogalactanas comparado ao clone sensível, sugerindo que as arabinogalactanas estão mais associadas na parede celular do clone tolerante. Arabinogalactanas do tipo II foram associadas, em muitos processos biológicos, à proliferação e sobrevivência celular. Foi proposto que arabinogalactanas do tipo II podem estar envolvidas no enrijecimento da parede celular por estresse oxidativo (SEIFERT; ROBERTS, 2007).

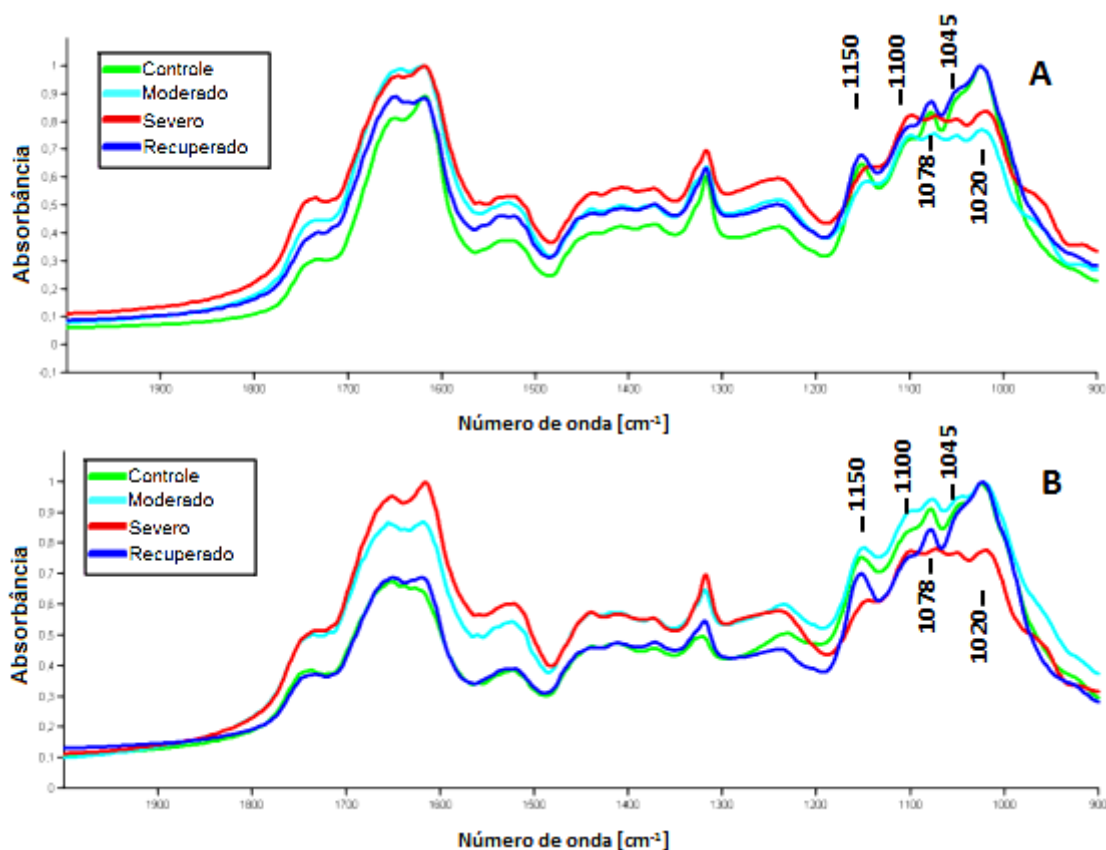


FIGURA 26- ESPECTRO DE FT-IR DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo.

Os perfis de eluição por HPSEC das frações W extraídas das folhas de plantas de *C. canephora*, tolerante e sensível ao estresse hídrico estão apresentados na FIGURA 27.

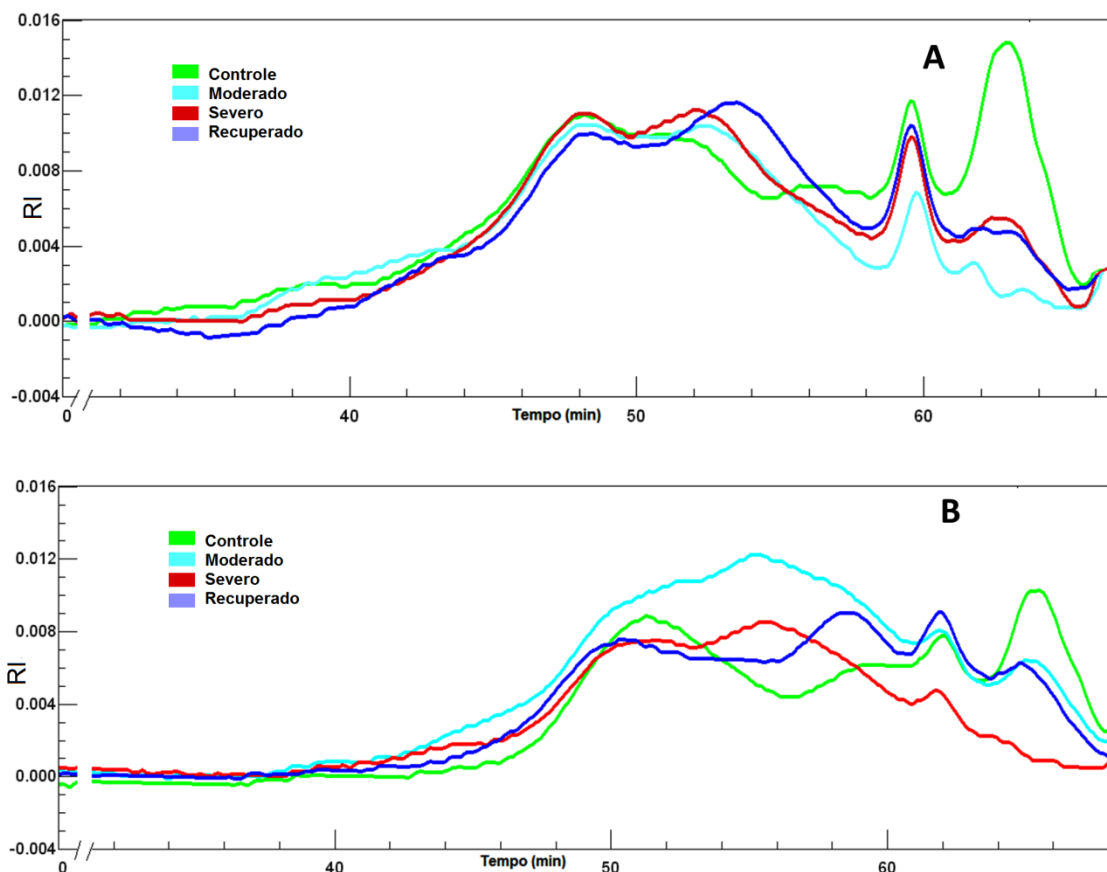


FIGURA 27- ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA A 80°C (FRAÇÃO W) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo.

As frações controle dos clones 14 e 109A apresentaram diferentes distribuições de massa molecular. Na fração controle obtida do clone tolerante observou-se a presença de um pico eluindo antes de 50 min, o qual está ausente na fração isolada do clone sensível. Além disto, de modo geral, o cromatograma da fração proveniente do clone tolerante apresenta tempos de eluição inferiores aos observados para a fração do clone sensível. Estes resultados sugerem a presença de polissacarídeos de maior massa molecular



no clone tolerante. Paredes celulares mais frouxas possuem polissacarídeos de tamanhos menores (TALBOTT; RAY, 1992), assim tamanhos maiores nesta fração sugerem que as paredes celulares dos clones tolerantes são mais rígidas em comparação ao sensível.

Durante o estresse hídrico, o clone sensível apresentou maiores alterações no perfil de eluição dos polissacarídeos da fração W que o clone tolerante (FIGURA 27). Nas frações de ambos os clones, os tempos de eluição foram deslocados para tempos maiores, indicando redução do tamanho dos polissacarídeos. Porém, o clone sensível apresentou diminuições mais acentuadas no tamanho dos polissacarídeos. Assim, em condições de estresse hídrico, o controle do tamanho dos polissacarídeos da fração pética extraída com água pode ter papel na tolerância ao estresse.

A composição monossacarídica da fração E controle dos clones de *C. canephora* apresentou ácidos urônicos e Glc como principais constituintes (FIGURA 28). O conteúdo de Glc da fração E proveniente do grupo controle no clone tolerante foi maior que no clone sensível.

Durante o estresse hídrico, na fração E do clone tolerante houve abrupto decréscimo do conteúdo de Glc, enquanto no clone tolerante houve aumento (FIGURA 28A).

Na fração E proveniente de plantas submetidas a estresse hídrico, para o clone tolerante houve aumento do conteúdo de Ara, Xyl e Gal, enquanto no clone sensível estes monossacarídeos foram diminuídos.

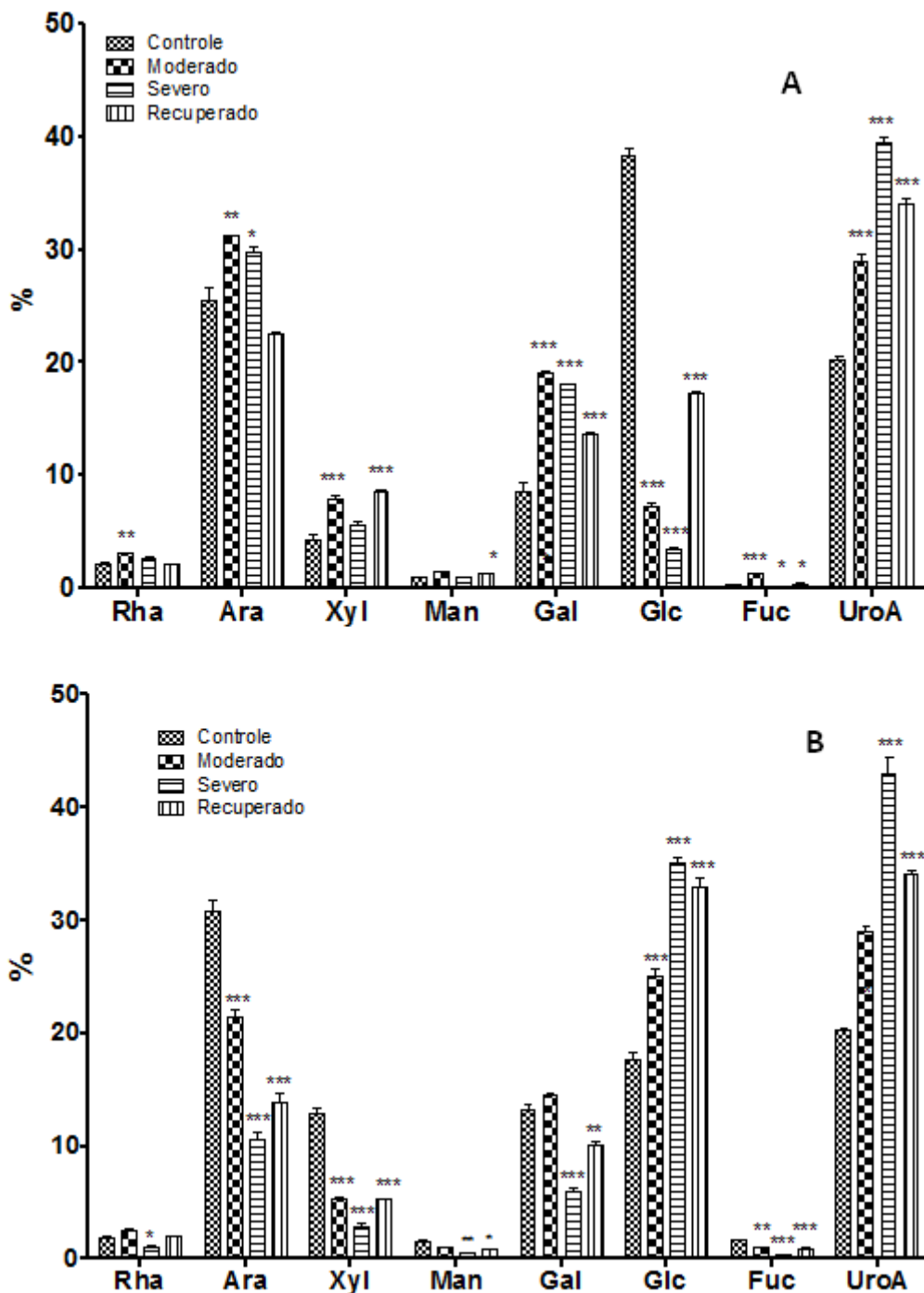


FIGURA 28- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM EDTA 2% (FRAÇÃO E) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

O perfil de eluição por HPSEC das frações E isoladas dos clones de *C. canephora* está apresentado na FIGURA 29. Os perfis de eluição das frações controle dos clones tolerante e sensível foram semelhantes. Porém, o pico principal na fração E do clone tolerante eluiu em 48 min, enquanto no clone sensível o pico correspondente eluiu em 50 min, sugerindo a presença de polissacarídeos maiores no clone tolerante. Polissacarídeos maiores sugerem maior rigidez da parede celular (TALBOTT; RAY, 1992). Assim, o clone tolerante possuiria parede celular mais rígida do que o clone sensível.

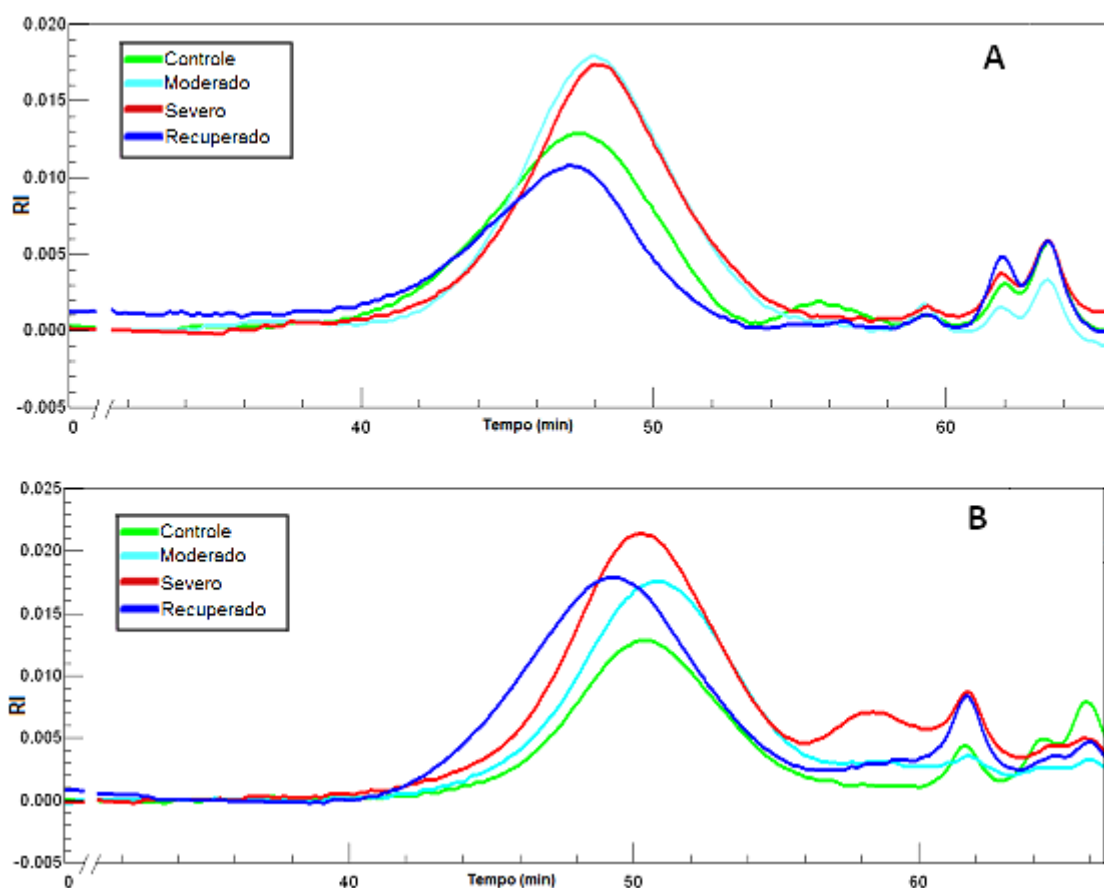


FIGURA 29- ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM EDTA 2% (FRAÇÃO E) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo.

De acordo com os cromatogramas das frações E obtidas durante o estresse hídrico (FIGURA 29), na fração do clone tolerante houve redução do tamanho dos polissacarídeos. Após a reidratação, o clone tolerante tendeu a retornar ao perfil de eluição do controle enquanto no clone sensível houve aumento do tamanho dos polissacarídeos.

#### 5.4.4 Polissacarídeos das frações hemicelulósicas

A fração hemicelulósica extraída a 30°C apresentou como principais monossacarídeos Xyl, Glc e Ara (FIGURA 30). A fração obtida do clone tolerante apresentou maior conteúdo de Xyl comparado ao clone sensível que apresentou Glc como principal monossacarídeo. Os resultados sugerem a presença de arabinoxilanas e xiloglucanas, como já relatado para as frações hemicelulósicas de *C. arabica* (CECY; CORRÊA, 1984).

Durante o estresse hídrico observou-se conteúdo de ácidos urônicos superior na fração H30 obtida a partir do clone tolerante em comparação ao clone sensível. O aumento de polissacarídeos ácidos em condições de estresse hídrico foi relatado em células de tabaco (*N. tabacum*) tolerantes ao estresse hídrico (IRAKI *et al.*, 1989b). Este aumento pode estar relacionado à extração de pectinas nesta fração, devido a forte associação destes componentes na parede celular (TABELA 4).

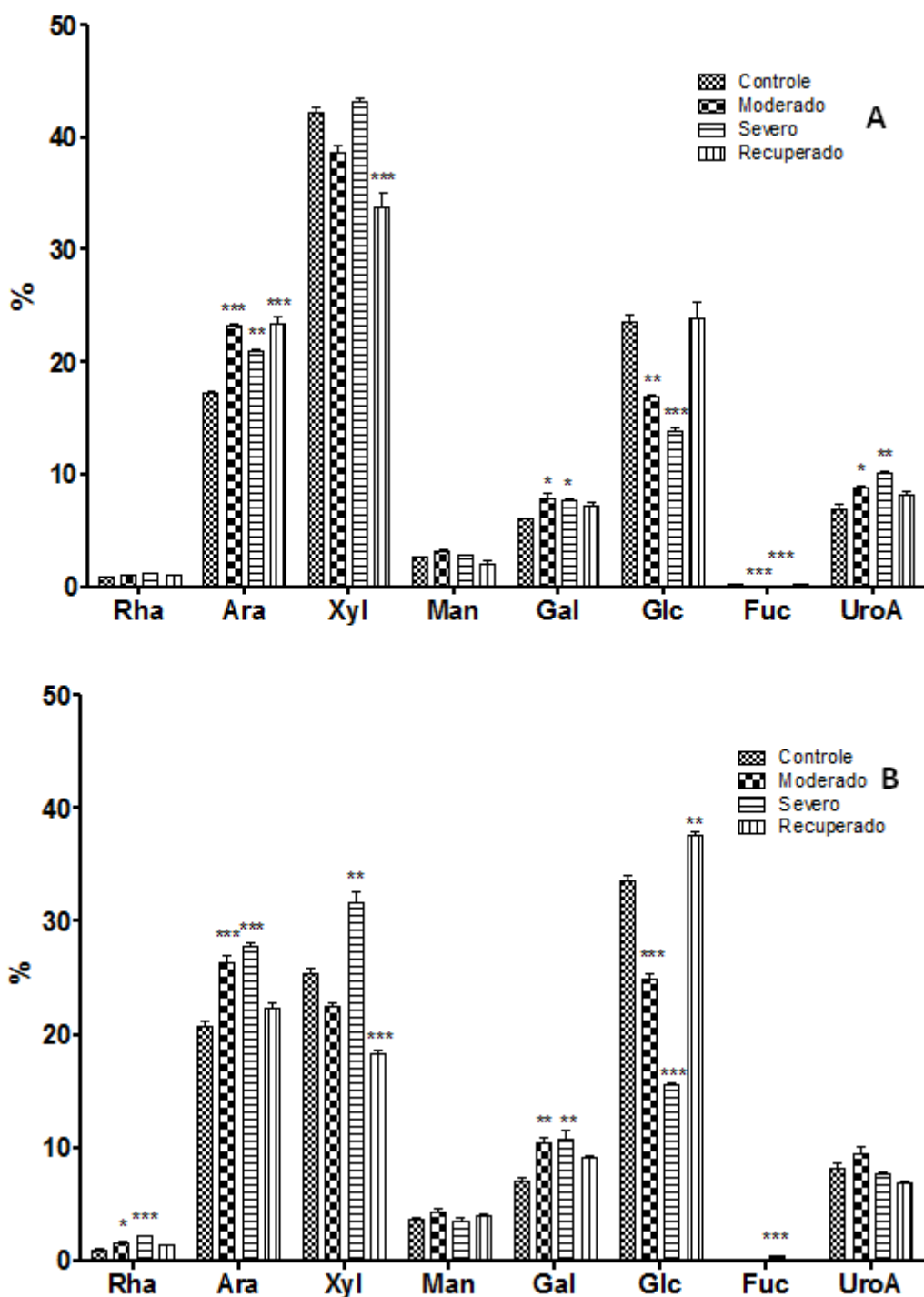


FIGURA 30- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Os resultados indicam que o estresse hídrico aumentou o conteúdo de Ara extraída de ambos os clones. Porém, o conteúdo de Xyl aumentou muito mais no clone sensível durante o estresse hídrico comparado ao clone tolerante. Esse resultado pode estar relacionado a maior resistência a solubilização de hemiceluloses contendo Xyl no clone tolerante devido a maiores associações destes polissacarídeos na parede celular.

Os espectros de FT-IR destas frações (FIGURA 31) apresentaram bandas relacionadas a arabinoxilanas (1408, 1164  $\text{cm}^{-1}$ ) (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 1994) e xiloglucanas (1078 1041  $\text{cm}^{-1}$ ) (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000).

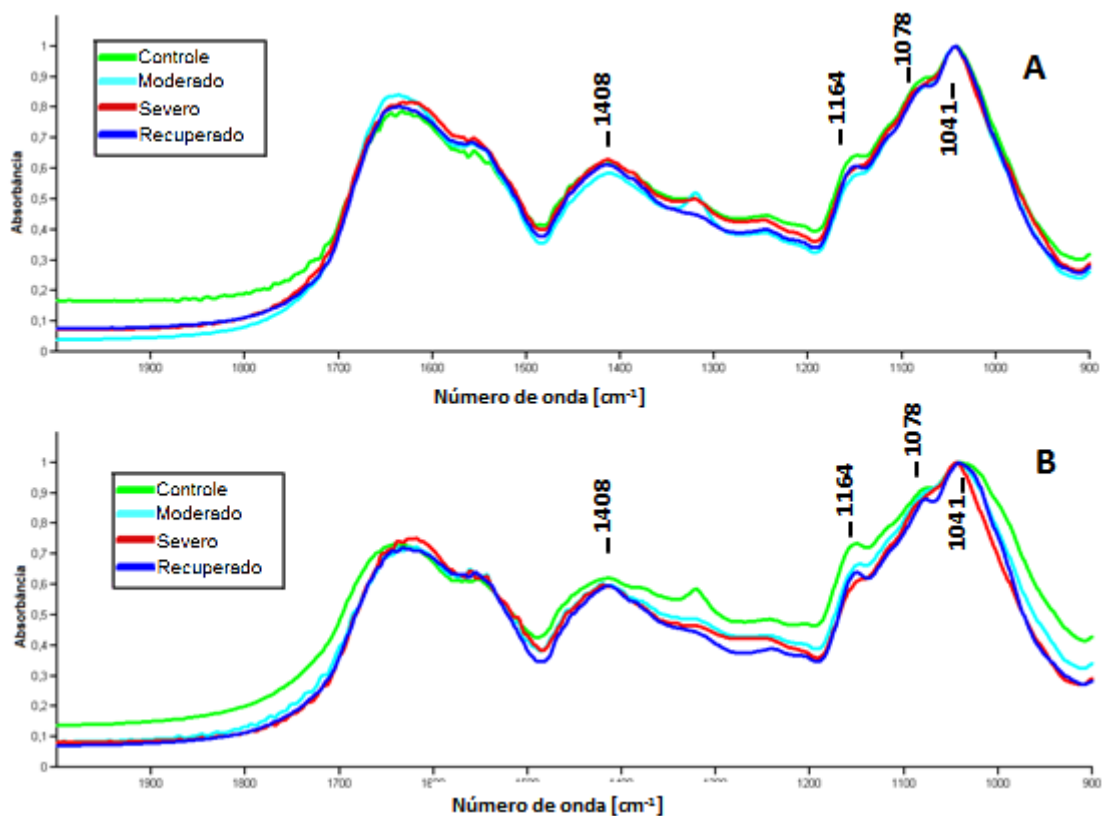


FIGURA 31- ESPECTRO DE FT-IR DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo.

Os perfis de eluição por HPSEC dos polissacarídeos das frações H30 dos clones sensíveis e tolerantes ao estresse hídrico foram diferentes entre si e mudanças mais acentuadas após as condições de estresse hídrico foram observadas para o clone sensível (FIGURA 32). De acordo com os cromatogramas, no clone tolerante os polissacarídeos eram maiores comparados ao clone sensível e após o estresse hídrico as concentrações relativas dos polissacarídeos maiores aumentaram nas amostras de ambos os clones. Porém, após a reidratação, o tamanho foi drasticamente diminuído no clone sensível comparado ao clone tolerante (FIGURA 32B). Assim, a fração H30 é muito mais sensível a alterações nos polissacarídeos comparada ao clone tolerante, confirmando a menor capacidade de tolerância ao estresse hídrico.

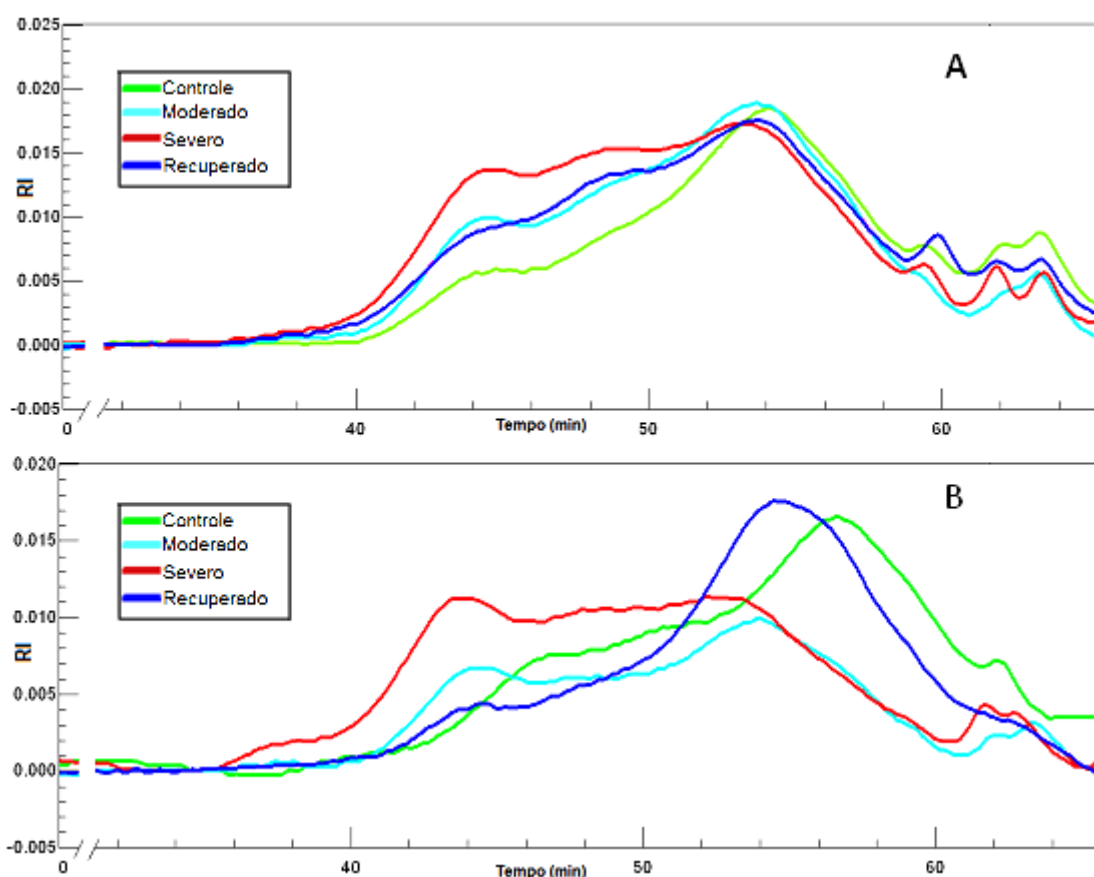


FIGURA 32- ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 30°C (FRAÇÃO H30) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo.

A fração H70 apresentou Xyl e Ara como principais monossacarídeos em ambos os clones (FIGURA 33). Ácidos urônicos também estão presentes em ambas as frações, provavelmente relacionados à presença de glucuronoxilanas típicas da parede secundária de eudicotiledôneas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

O estresse hídrico alterou a solubilização dos polissacarídeos extraídos com NaOH a 70°C principalmente no clone tolerante. No clone tolerante houve maior solubilização de polissacarídeos contendo Xyl, provavelmente por aumentar a solubilização de xilanas em condições de estresse hídrico, como relatado em plantas ressurreição em condições de dessecação (MOORE, 2006), enquanto o conteúdo de Ara, Glc e Gal diminuíram (FIGURA 33B).



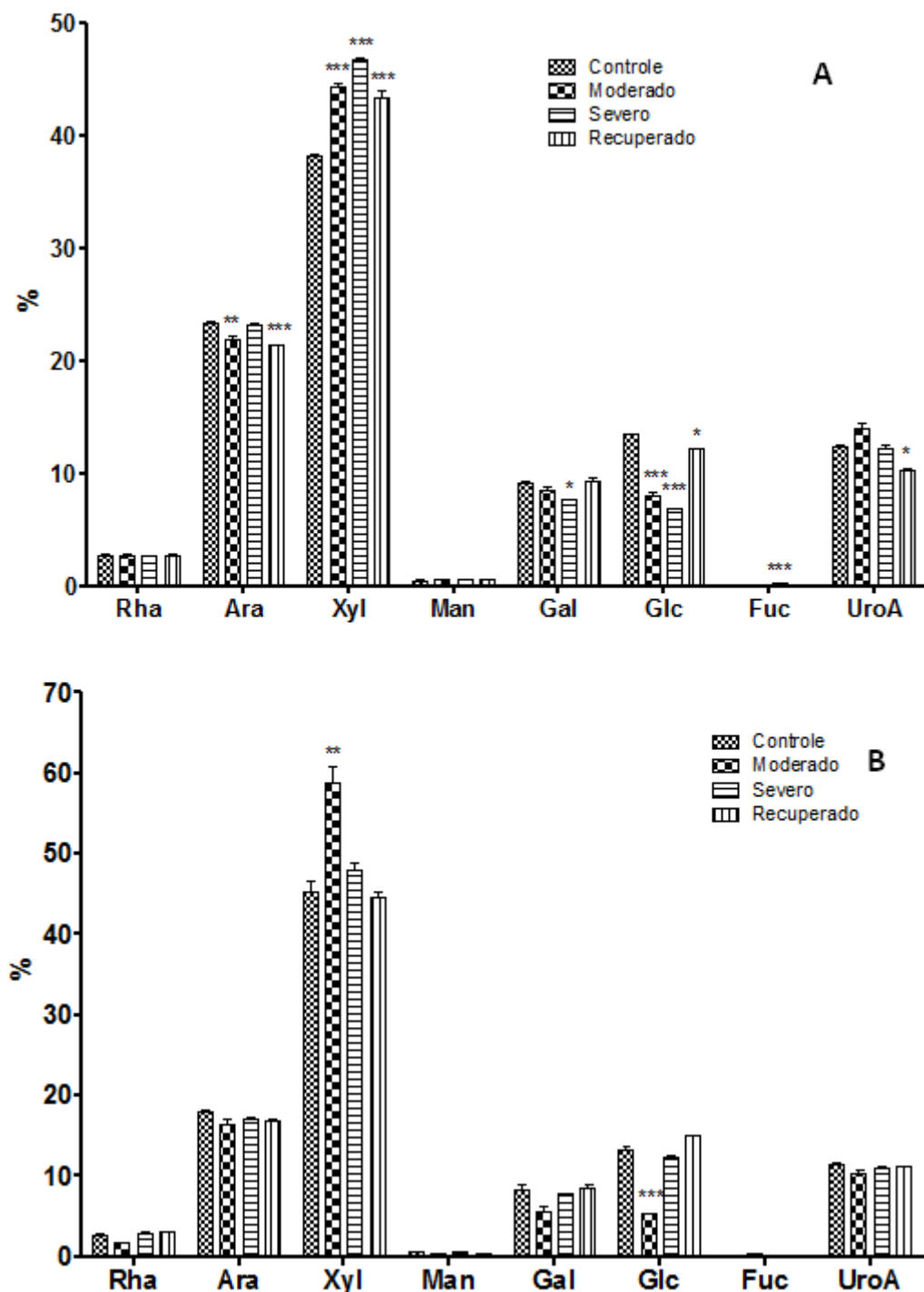


FIGURA 33- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM  $\text{NaOH } 4\text{MOL.L}^{-1}$  A  $70^\circ\text{C}$  (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle:  $-1,34\text{ MPa}$ ; Moderado:  $-2,39\text{ MPa}$ ; Severo:  $-4,5\text{ MPa}$ ; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Em relação ao espectro de FT-IR, a fração H70 apresentou também as mesmas bandas da fração H30, sugerindo a presença das mesmas hemiceluloses nas duas frações (FIGURA 34).

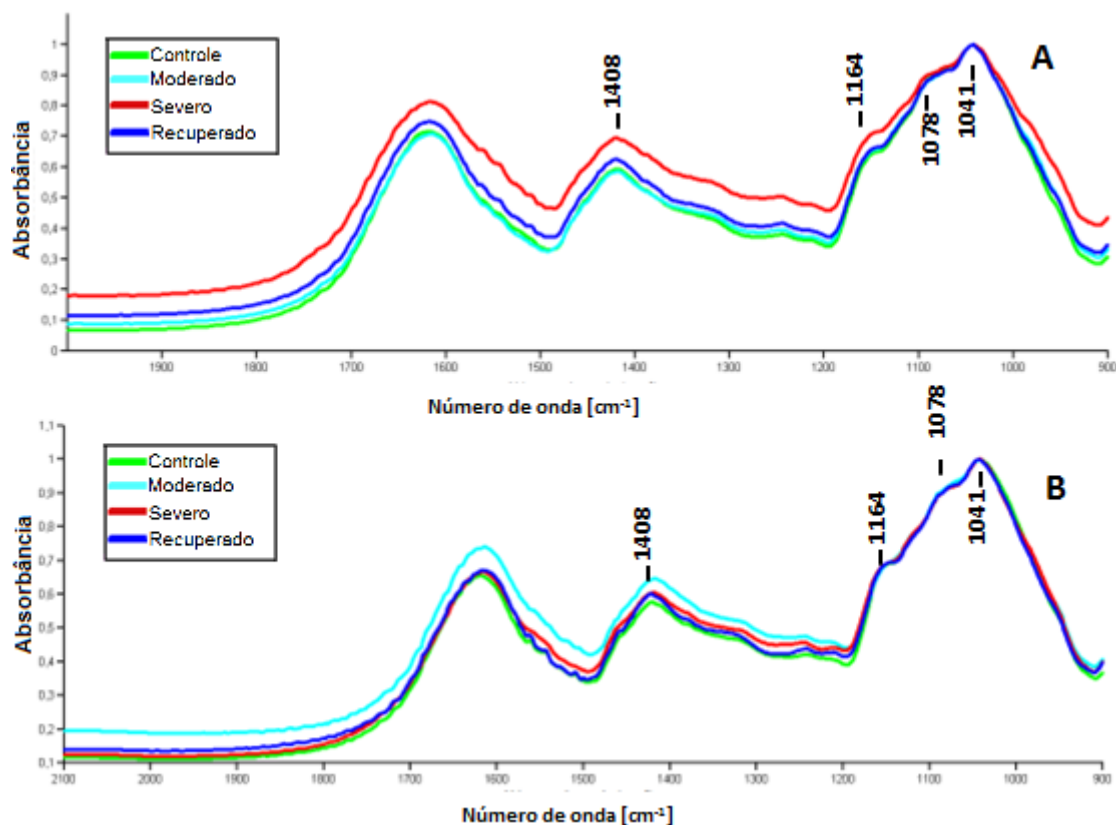


FIGURA 34- ESPECTRO DE FT-IR DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B), SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo.

Os perfis de eluição por HPSEC das frações H70 de ambos os clones estão apresentados na FIGURA 35. A fração controle do clone tolerante apresentou o principal pico no tempo de eluição de 54 min, enquanto o clone tolerante no tempo de 57 min sugerindo polissacarídeos maiores na fração H70 do clone tolerante comparada ao clone sensível. Durante o estresse hídrico, houve deslocamento para tempos de eluição menores em ambos os clones, indicando aumento do tamanho dos polissacarídeos. Porém, durante a

reidratação o clone sensível alterou drasticamente a eluição dos polissacarídeos, enquanto que o clone tolerante deslocou modestamente os picos para tempos de eluição maiores. Tais resultados indicam que o clone tolerante aumenta o tamanho dos polissacarídeos durante o estresse hídrico e após a reidratação possui poucas alterações comparadas ao clone tolerante que diminuí drasticamente seus polissacarídeos na fração H70.

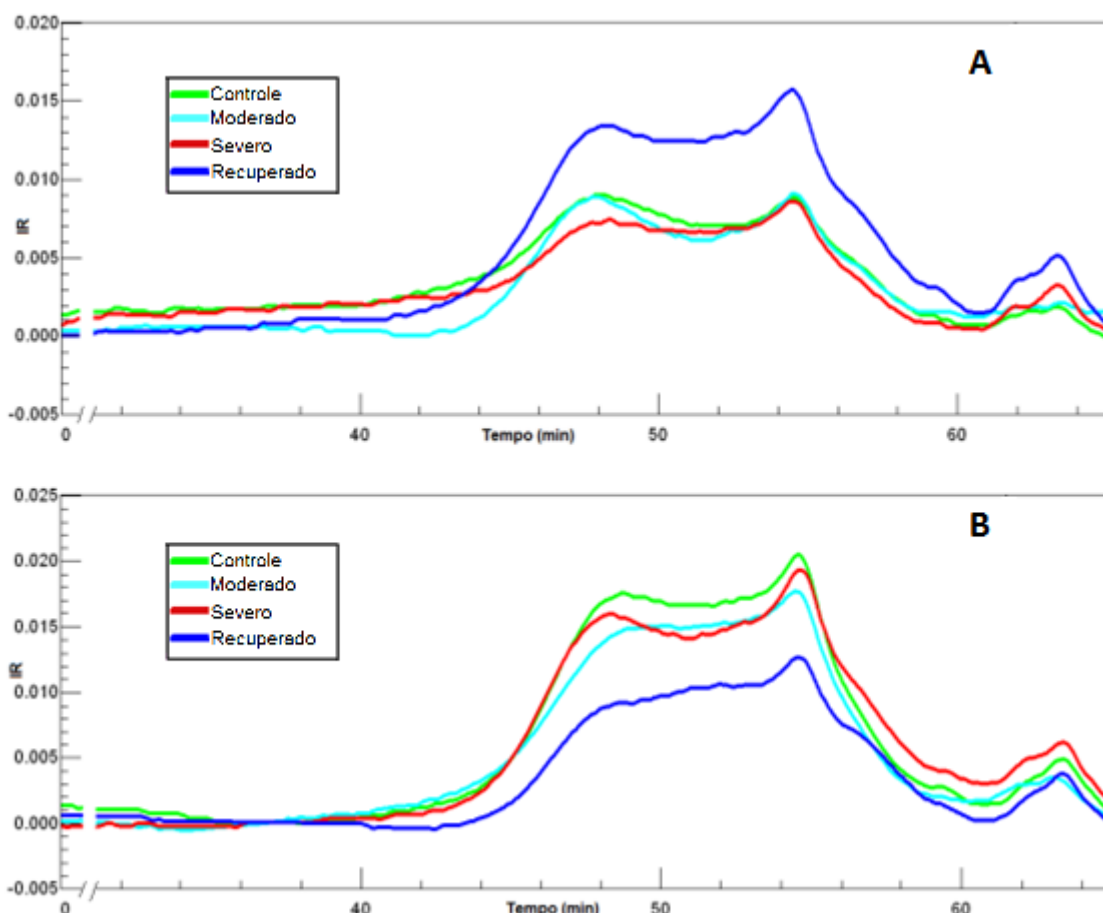


FIGURA 35- ANÁLISE POR HPSEC COM DETECTOR DE RI DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM NaOH 4MOL.L<sup>-1</sup> A 70°C (FRAÇÃO H70) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo.

#### 5.4.5 Polissacarídeos da fração lignocelulósica

A Glc foi o principal monossacarídeo encontrado no resíduo final insolúvel proveniente de ambos os clones (FIGURA 36). No entanto, o resíduo final tem elevado conteúdo de monossacarídeos não celulósicos. O mais abundante destes foi Xyl, seguido por Ara, ácidos urônicos, Gal, Man, Rha e traços de Fuc.

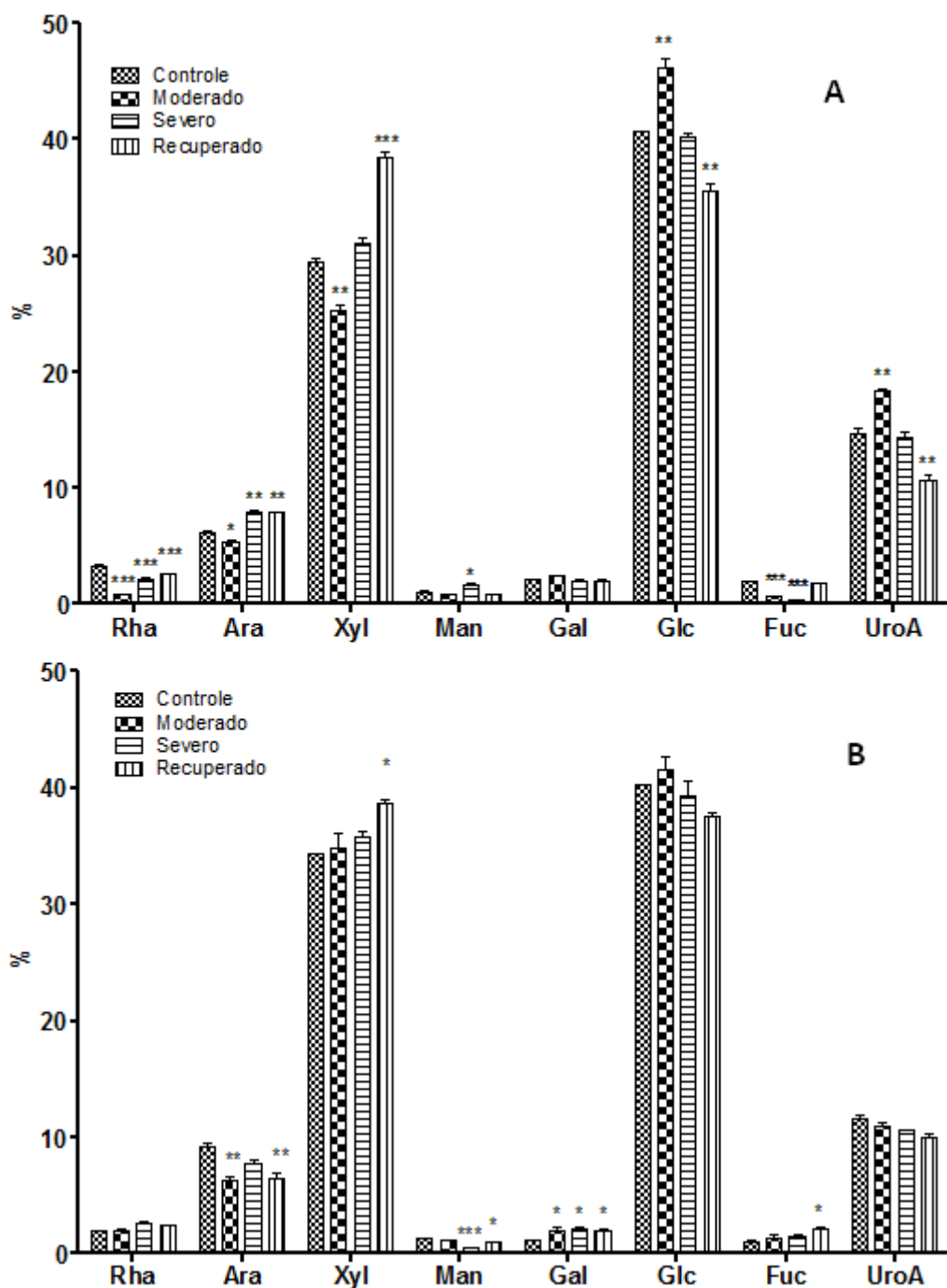


FIGURA 36- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo. Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ: ASBOE, 1973). Barra de erros indicam S.E. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

O espectro de FT-IR da fração R (FIGURA 37) apresenta bandas correspondentes à celulose em 1424, 1370, 1162, 1120, 1059, 1033  $\text{cm}^{-1}$  (BARON-EPEL; GHARYAL; SCHINDLER, 1988; KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000; MARGA; GALLO; HASENSTEIN, 2003; SIMONOVIĆ *et al.*, 2011) e a lignina em 1505 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  (SIMONOVIĆ *et al.*, 2011).

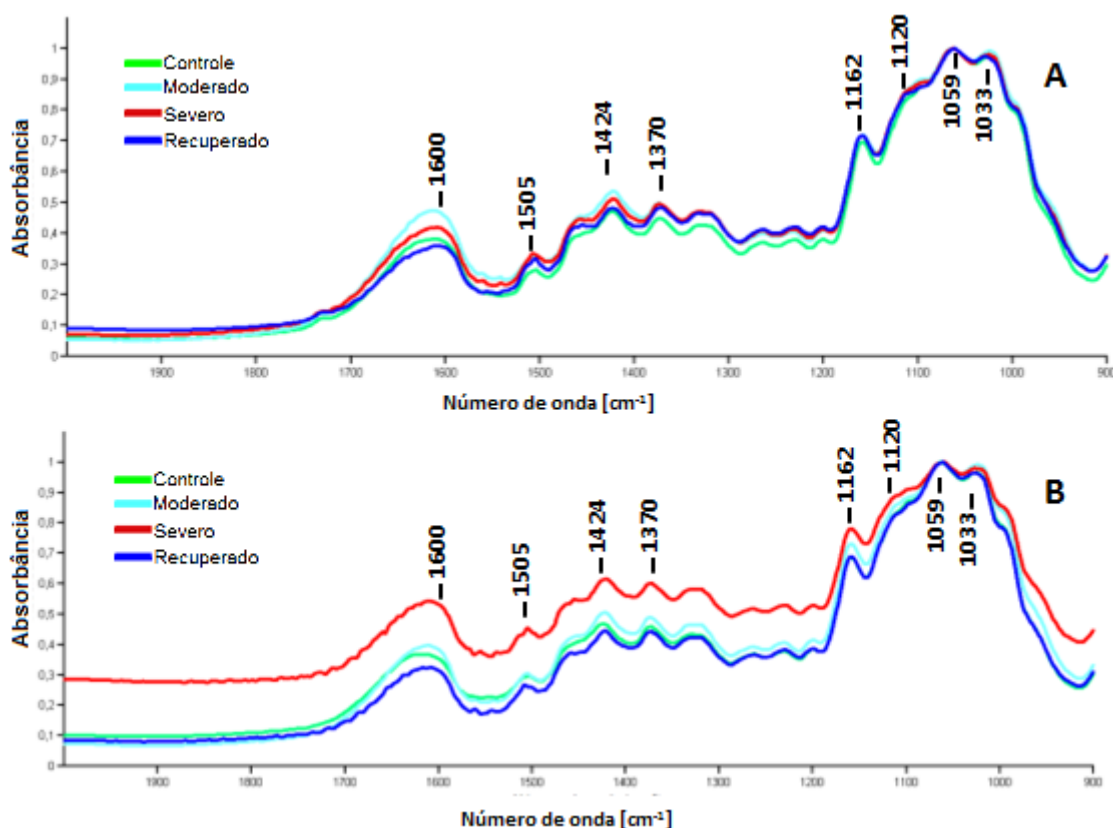


FIGURA 37- ESPECTRO DE FT-IR DOS POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO FINAL INSOLÚVEL (FRAÇÃO R) DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14) (A) E SENSÍVEL (CLONE 109A) (B) SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO.

NOTA: Potencial hídrico foliar: Controle: -1,34 MPa; Moderado: -2,39 MPa; Severo: -4,5 MPa; Recuperado: material coletado 72 h após re-irrigação das plantas depois destas atingirem o potencial hídrico estabelecido como estresse severo.

#### 5.4.6 Microscopia eletrônica

A ultraestrutura das células do mesófilo de *C. canephora* tolerante (FIGURA 38) e sensível ao estresse hídrico (FIGURA 39) demonstra

diminuição do conteúdo de amido em ambos os clones em condições de estresse hídrico. Destaca-se conteúdo maior de amido no clone sensível e maior redução deste na condição de estresse severo comparado ao clone tolerante. Diferencialmente ao *C. arabica* este clone não apresentou os plastoglóbulo.

Os cloroplastos de ambos os clones apresentaram-se desordenados na condição de estresse severo. O clone sensível apresentou-se mais ordenado após a recuperação do que o clone tolerante, o que pode estar relacionado ao seu maior conteúdo de amido nos cloroplastos. Assim, a ultraestrutura do clone tolerante apresenta alterações mais lentas que o clone sensível.

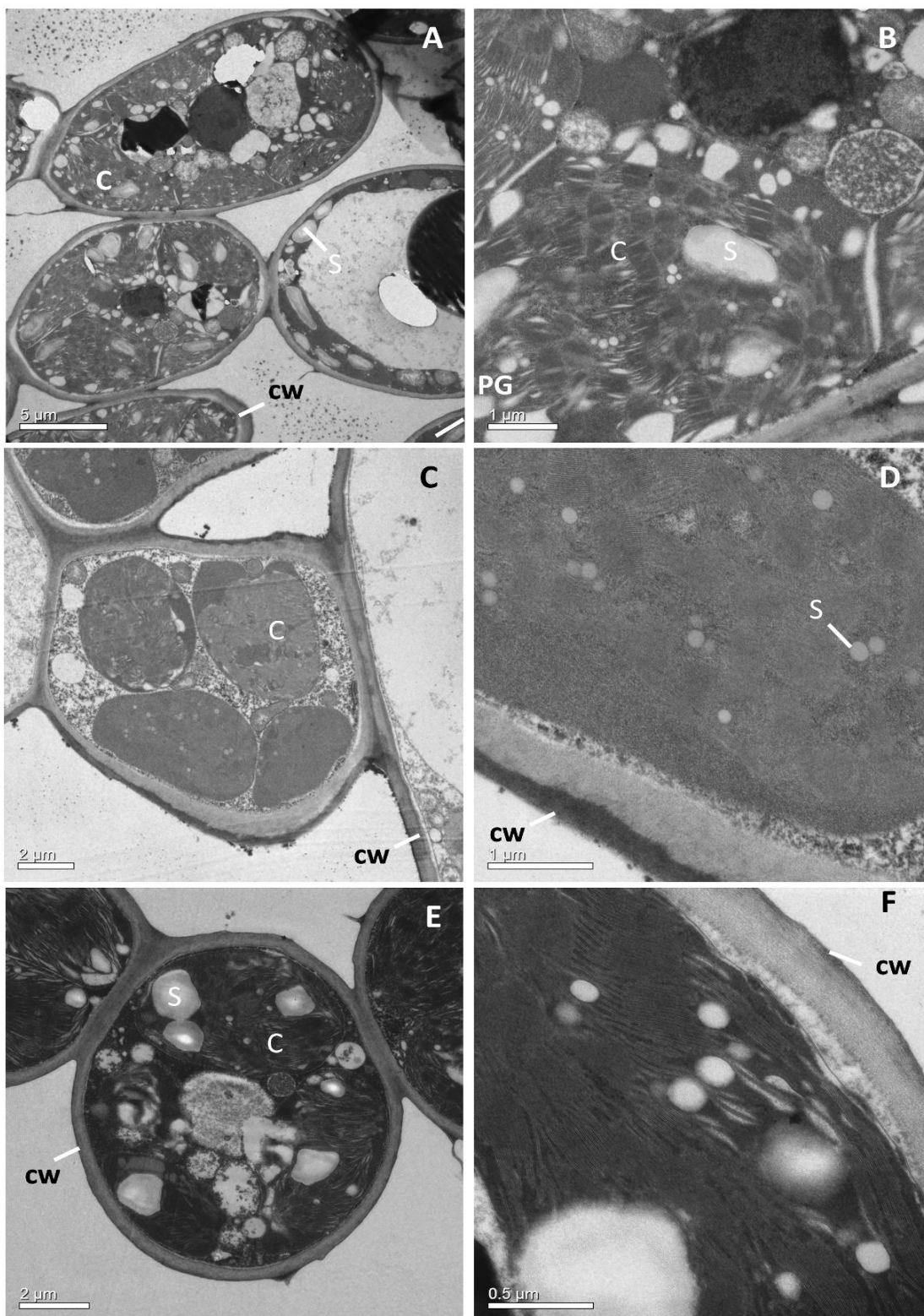


FIGURA 38- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE *C. canephora* TOLERANTE (CLONE 14). CÉLULAS CONTROLE (A); CLOROPLASTOS CONTROLE (B); CÉLULAS DO ESTRESSE SEVERO (C); CLOROPLASTOS DO ESTRESSE SEVERO (D); CÉLULAS RECUPERADAS DO ESTRESSE HÍDRICO (E); E CLOROPLASTOS DE CÉLULAS RECUPERADAS DO ESTRESSE HÍDRICO (F).

NOTA: Parede Celular (CW); Mitocôndria (M); Plastoglóbulos (PG); Cloroplastos (C); Tilacóides (T); E Amido (S).



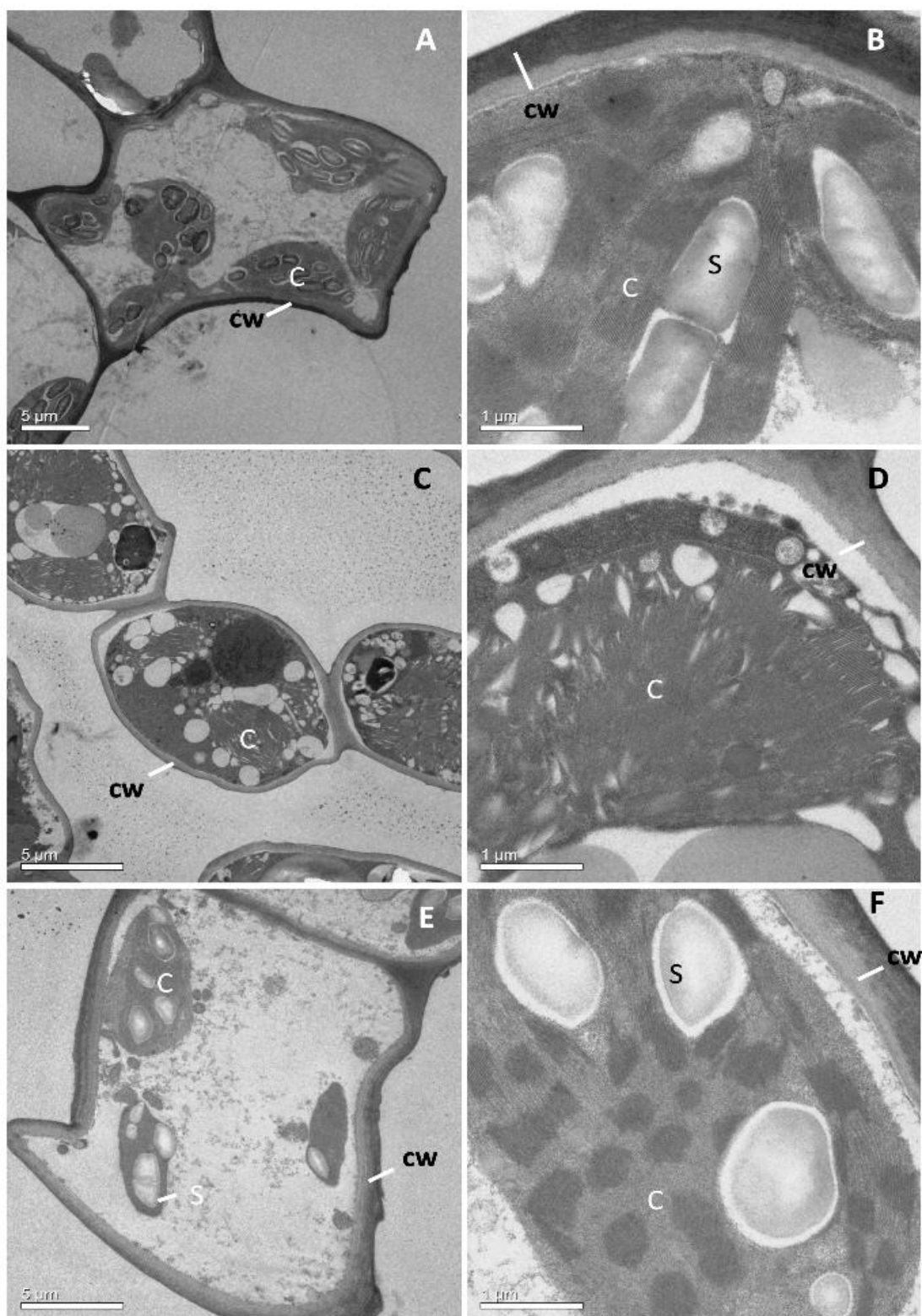


FIGURA 39- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS CÉLULAS DO MESOFILO DAS FOLHAS DE *C. canephora* SENSÍVEL (CLONE 109A). CÉLULAS CONTROLE (A); CLOROPLASTOS CONTROLE (B); CÉLULAS DO ESTRESSE SEVERO (C); CLOROPLASTOS DO ESTRESSE SEVERO (D); CÉLULAS RECUPERADAS DO ESTRESSE HÍDRICO (E); E CLOROPLASTOS DE CÉLULAS RECUPERADAS DO ESTRESSE HÍDRICO (F).

NOTA: Parede Celular (CW); Mitocôndria (M); Plastoglóbulo (PG); Cloroplastos (C); Tilacoides (T); E Amido (S).



## 6. CONCLUSÃO

As análises das folhas de café submetidas aos estresses abióticos indicaram alterações nos componentes da parede celular (polissacarídeos e lignina), além de alterações composição dos oligossacarídeos e na ultraestrutura celular das células do mesófilo.

Os estresses térmico e salino causaram modificações relacionadas com enrijecimento da parede celular, como aumento do tamanho dos polissacarídeos e do conteúdo de lignina, enquanto o estresse hídrico causou afrouxamento da parede celular em *C. arabica*. Estruturalmente, os estresses térmico e salino diminuíram o conteúdo de grânulos de amido e alteraram as organizações de membranas internas, diminuíram o tamanho geral das células do mesófilo, principalmente do parênquima paliçádico. Por outro lado, o estresse hídrico causou efeitos opostos nos clones de *C. canephora* tolerante (clone 14) e sensível (clone 109A) ao estresse hídrico. Quando comparado ao clone sensível, o clone tolerante apresentou resultados que indicam maior enrijecimento da parede celular, sugerindo que esta pode ser uma característica relacionada à maior tolerância ao estresse hídrico.

## REFERÊNCIAS

ACEBES, J. L. *et al.* Pine xyloglucan. Occurrence, localization and interaction with cellulose. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 417-422, 1993.

ACEVEDO, E.; HSIAO, T. C.; HENDERSON, D. W. Immediate and subsequent growth responses of maize leaves to changes in water status. **Plant Physiology**, v. 48, p. 631-636, 1971.

ALBERSHEIM, P. *et al.* Structure and functions studies of plant cell wall polysaccharides. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, p. 374-378, 1994.

ALBERSHEIM, P. *et al.* **Plant cell walls: From Chemistry to Biology**. 1. New York: Garland Science, 2010. 430

ALBINI, F. M. *et al.* Low-molecular weight substances from the resurrection plant *Sporobolus stapfianus*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 137-142, 1994.

ASHRAF, M.; KHANUM, A. Relationship between ion accumulation and growth in two spring wheat lines differing in salt tolerance at different growth stages. **Journal Agronomy & Crop Science**, v. 178, p. 39-51, 1997.

ASHWORTH, E. N.; ABELES, F. B. Freezing behavior of water in small pores and the possible role in the freezing of plant tissues. **Plant Physiology**, v. 76, p. 201-204, 1984.

AWANO, T. *et al.* Deposition of glucuronoxylans on the secondary cell wall of Japanese beech as observed by immuno-scanning electron microscopy. **Protoplasma**, v. 212, p. 72-79, 2000.

AYRE, B. G. Symplastic Continuity between Companion Cells and the Translocation Stream: Long-Distance Transport Is Controlled by Retention and Retrieval Mechanisms in the Phloem. **Plant Physiology**, v. 131, n. 4, p. 1518-1528, 2003.

BACHMANN, M.; MATILE, P.; KELLER, F. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1335-1345, 1994.

BACIC, A.; MOODY, S. F.; CLARKE, A. E. Structural analysis of secreted root slime from maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology**, v. 80, p. 771-777, 1986.

BAI, L.; HU, H.; XU, J. Influences of configuration and molecular weight of hemicelluloses on their paper-strengthening effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1258-1263, 2012.

BARAKAT, A. *et al.* Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins formed by bulk and end-wise polymerization: a model study of lignin carbohydrate complex formation. **Planta**, v. 226, n. 1, p. 267-281, 2007.

BARON-EPEL, O.; GHARYAL, P. K.; SCHINDLER, M. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. **Planta**, v. 175, p. 389-395, 1988.

BAUER, W. D. *et al.* The structure of plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 51, p. 174-187, 1973.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, p. 51-56, 1992.

BISHOP, D. L. *et al.* Changes in carbohydrate coordinated partitioning and cell wall remodeling with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 53-63, 2002.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New Method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, p. 484-489, 1973.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519-546, 2003.

BOFFEY, S. A.; NORTHCOTE, D. H. Pectin synthesis during the wall regeneration of plasmolysed tobacco leaf cells. **Biochemistry Journal**, v. 150, p. 433-440, 1975.

BOTELLA, M. A. *et al.* Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. **Plant Molecular Biology**, v. 25, p. 105-114, 1994.

BOURQUIN, V. *et al.* Xyloglucan Endotransglycosylases Have a Function during the Formation of Secondary Cell Walls of Vascular Tissues. **The Plant Cell Online**, v. 14, n. 12, p. 3073-3088, 2002.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2000.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 525-531, 2001.

CAPEK, P. A water soluble glucomannan isolated from an immunomodulatory active polysaccharide of *Salvia officinalis* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 356-359, 2009.

CAPEK, P. *et al.* Structural features of an arabinogalactan-protein isolated from instant coffee powder of *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 180-185, 2010.

CARAMORI, L. P. C.; CARAMORI, P. H.; MANETTI-FILHO, J. Effect of leaf water potential on cold tolerance of *Coffea arabica* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 439-443, 2002.

CARDEMIL, L.; RIQUELME, A. Expression of cell wall protein in seeds and during early seedling growth of *Araucaria araucana* is a response to wound stress and is developmentally regulated. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 415-421, 1991.

CARPITA, N. C. Hemicellulosic polymers of cell walls of *Zea* Coleopiles. **Plant Physiology**, v. 72, p. 515-521, 1983.

CARPITA, N. C. Progress in the biological synthesis of the plant cell wall: new ideas for improving biomass for bioenergy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1-8, 2011.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N. C.; MACCANN, M. C. The functions of cell wall polysaccharides in composition and architecture revealed through mutations. **Plant and Soil**, v. 347, n. 71-80, 2002.

CARR, M. K. V. The water relations and irrigation requirements of coffee. **Experimental Agriculture**, v. 37, p. 1-36, 2001.

CARVALHO, A. *et al.* Aspectos genéticos do cafeeiro. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, p. 135-183, 1991.

CASTILLO, E. M. *et al.* Raffinose Synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 351-355, 1990.

CAVALIER, D. M. *et al.* Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. **The Plant Cell Online**, v. 20, n. 6, p. 1519-1537, 2008.

CAVATTE, P. C. *et al.* Functional analysis of the relative growth rate, chemical composition, construction and maintenance costs, and the payback time of *Coffea arabica* L. leaves in response to light and water availability. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 8, p. 3071-3082, 2012.

CECY, I. I. T.; CORRÊA, J. B. C. Hemicellulosic polymers from the leaves of *Coffea arabica*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 6, p. 1271-1276, 1984.

CEUSTERS, J. *et al.* Glucuronoarabinoxylan structure in the walls of *Aechmea* leaf chlorenchyma cells is related to wall strength. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2307-2311, 2008.

CHANLIAUD, E. *et al.* Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites. **The Plant Journal**, v. 38, p. 27-37, 2004.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264, 2003.

CHAWLA, S.; JAIN, S.; JAIN, V. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza*

*sativa* L.). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 27-34, 2012.

CHO, S. *et al.* Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. **FEBS Letters**, v. 580, n. 13, p. 3136-3144, 2006.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasil 2011.

COSGROVE, D. J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 50, p. 391-417, 1999.

CRUZ, A. K. M. *et al.* Structural elucidation of an acidic galactan from the eggs of mollusc *Pomacea lineata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 975-980, 2010.

DAMATTA, F. M. *et al.* Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, v. 164, p. 111-117, 2003.

DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 55-81, 2006.

DARVILL, J. E. *et al.* Structure of plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 66, p. 1135-1139, 1980.

DEAN, J. F. D., Ed. **Lignin analysis**. Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology: CRC Press, p.199-215, Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology. 1997.

DIAS, P. *et al.* Morphological and physiological responses of two coffee progenies to soil water availability. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 12, p. 1639-1647, 2007.

DINAR, M.; RUDICH, J.; ZAMSKI, E. Effects of heat stress on carbon transport from tomato leaves. **Annals of Botany**, v. 51, p. 97-103, 1983.



DJANAGUIRAMAN, M. *et al.* High-temperature stress and soybean leaves: Leaf anatomy and photosynthesis. **Crop Science**, v. 51, n. 5, p. 2125-2131, 2011.

DOBLIN, M. S.; PETTOLINO, F.; BACIC, A. Plant cell walls: the skeleton of the plant world. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 357-381, 2010.

DRINNAN, J. E.; MENZEL, C. M. Temperature affects vegetative growth and flowering of coffee (*Coffea arabica* L.) following water stress during flower initiation. **Journal of Horticultural Science**, v. 69, p. 841-849, 1995.

DUAN, J. *et al.* Structural features of a pectic arabinogalactan with immunological activity from the leaves of *Diospyros kaki*. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 12, p. 1291-1297, 2003.

DUAN, J. *et al.* Structural analysis of a pectic polysaccharide from the leaves of *Diospyros kaki*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 5, p. 609-615, 2004.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EDELMANN, H. G.; FRY, S. C. Factors that affect the extraction of xyloglucan from the primary cell walls of suspension-cultured rose cells. **Carbohydrate Research**, v. 228, p. 423-431, 1992.

EIRA, M. T. S. *et al.* Coffee seed physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 149-163, 2006.

ENCINA, A. E. *et al.* Characterization of cell wall in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures tolerant to dichlobenil. **Plant Science**, v. 160, p. 331-339, 2001.

EVERT, R. F. **Esau's plant anatomy**. 3. John Wiley & Sons, 2006.

FAN, L. The Spatially Variable Inhibition by Water Deficit of Maize Root Growth Correlates with Altered Profiles of Proton Flux and Cell Wall pH. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 2291-2300, 2004.

FAN, L. Progressive Inhibition by Water Deficit of Cell Wall Extensibility and Growth along the Elongation Zone of Maize Roots Is Related to Increased Lignin Metabolism and Progressive Stelar Accumulation of Wall Phenolics. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 603-612, 2006.

FARRANT, J. M. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. **Plant Ecology**, v. 151, p. 29-39, 2000.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

FIGUEIRÊDO, V. B.; FARIA, M. A. D.; SILVA, E. L. D. Crescimento inicial do cafeeiro irrigado com água salina e salinização do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 1, p. 50-57, 2005.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A. Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

FISARAKIS, I.; CHARTZOULAKIS, K.; STAVRAKAS, D. Response of sultana vine (*V. vinifera* L.) on six rootstocks to NaCl salinity exposure and recovery. **Agricultural Water Management**, v. 51, p. 13-27, 2001.

FLEXAS, J. *et al.* Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. **Plant Biology**, v. 6, p. 1-11, 2004.

FRESHOUR, G. *et al.* Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1413-1429, 1996.

FRY, S. C. Gibberellin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells. **Phytochemistry**, v. 19, p. 735-740, 1980.

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, p. 165-186, 1986.

FRY, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, v. 161, p. 641-675, 2004.

GAFF, D. F. Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa. **Science**, v. 174, p. 1033-1034, 1971.

GILKES, N. R.; HALL, M. A. The hormonal control of cell wall turnover in *Pisum sativum* L. **New Phytologist**, v. 78, p. 1-15, 1977.

GOMEZ, F. *et al.* Heat shock increases mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and extends postharvest life of spinach leaves. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 229-234, 2008.

GORETA, S. *et al.* Vegetative growth, superoxide dismutase activity and ion concentration of salt-stressed watermelon as influenced by rootstock. **The Journal of Agricultural Science**, v. 146, n. 06, p. 695, 2008.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.

GULEN, H.; ERIS, A. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. **Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 739-744, 2004.

HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2012.

HAMEED, A.; GOHER, M.; IQBAL, N. Heat Stress-Induced Cell Death, Changes in Antioxidants, Lipid Peroxidation, and Protease Activity in Wheat Leaves. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, n. 3, p. 283-291, 2011.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 431-438, 2001.

HOLLAND, N. *et al.* High-temperature conditioning induces chilling tolerance in mandarin fruit: a cell wall approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. n/a-n/a, 2012.

HOSON, T. Apoplast as the site of response to environmental signals. **Journal of Plant Research**, v. 111, p. 167-177, 1998.

HUANG, R.; BECKER, A. A.; JONES, I. A. Modelling cell wall growth using a fibre-reinforced hyperelastic-viscoplastic constitutive law. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 60, p. 750-783, 2012.

IBRAHEEM, O. *et al.* The effect of drought and salinity on the expressional levels of sucrose transporters in rice (*Oryza sativa* Nipponbare) cultivar plants. **Plant Omics Journal**, v. 4, n. 2, p. 68-74, 2011.

IMAMURA, T. *et al.* Ester linkages between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes from *Fagus crenata*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1165-1173, 1994.

IRAKI, N. M.; BRESSAN, R. A.; CARPITA, N. C. Extracellular polysaccharides and proteins of tobacco cell cultures and changes in composition associated with growth-limiting adaptation to water and saline stress. **Plant Physiology**, v. 91, p. 54-61, 1989.

IRAKI, N. M. *et al.* Alteration of the physical and chemical structure of primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress. **Plant Physiology**, v. 91, p. 39-47, 1989a.

IRAKI, N. M. *et al.* Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. **Plant Physiology**, v. 91, p. 48-53, 1989b.

JAIN, M. *et al.* Short-term high temperature growth conditions during vegetative-to-reproductive phase transition irreversibly compromise cell wall invertase-mediated sucrose catalysis and microspore meiosis in grain sorghum (*Sorghum bicolor*). **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 7, p. 578-582, 2010.

JANG, J.-C.; SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1665-1679, 1994.

JANZ, D. *et al.* Pathway analysis of the transcriptome and metabolome of salt sensitive and tolerant poplar species reveals evolutionary adaption of stress tolerance mechanisms. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 150, 2010.

JARVIS, M. C.; MACCANN, M. C. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: concepts and methodology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 1-13, 2000.

JONES, L. From the Cover: Cell wall arabinan is essential for guard cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11783-11788, 2003.

KAČURÁKOVÁ, M. *et al.* FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 195-203, 2000.

KAČURÁKOVÁ, M. *et al.* Infrared study of arabinoxylans. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 66, p. 423-427, 1994.

KAČURÁKOVÁ, M. *et al.* Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 35-41, 1999.

KALLIS, G. Droughts. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 33, n. 1, p. 85-118, 2008.

KARDOSOVÁ, A.; MATULOVÁ, M.; MALOVÍKOVÁ, A. (4-O-Methyl- $\alpha$ -D-glucurono)-D-xylan from *Rudbeckia fulgida*, var. *sullivantii* (Boynton et Beadle). **Carbohydrate Research**, v. 308, p. 99-105, 1998.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KEEGSTRA, K. *et al.* The structure of plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 51, p. 188-196, 1973.

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

KIM, J. S.; DANIEL, G. Distribution of glucomannans and xylans in poplar xylem and their changes under tension stress. **Planta**, 2012a.

KIM, J. S.; DANIEL, G. Immunolocalization of hemicelluloses in *Arabidopsis thaliana* stem. Part II: Mannan deposition is regulated by phase of development

and its patterns of temporal and spatial distribution differ between cell types. **Planta**, 2012b.

KOLEVA, M.; GIOREVA, D. A glucomannan isolated from the leaves of *Arum maculatum* L. **Carbohydrate Research**, v. 155, p. 290-293, 1986.

KONNO, H.; NAKATO, T.; TSUMUKI, H. Altered matrix polysaccharides in cell walls of pocket galls formed by an aphid on *Distylium racemosum* leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 1973-1983, 2003.

KONNO, H. *et al.* Differential changes in cell wall matrix polysaccharides and glycoside-hydrolyzing enzymes in developing wheat seedlings differing in drought tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 7, p. 745-754, 2008.

KOSOVÁ, K. *et al.* Plant proteome changes under abiotic stress – contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 8, p. 1301-1322, 2011.

KOTAK, S. *et al.* Complexity of the heat stress response in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 310-316, 2007.

KRAUSE, G. H.; SANTARIUS, K. A. Relative thermostability of the chloroplast envelope. **Planta**, v. 127, p. 285-299, 1975.

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

LABAVITCH, J. M.; RAY, P. M. Relationship between promotion of xyloglucan metabolism and induction of elongation by indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 54, p. 499-502, 1974a.

LABAVITCH, J. M.; RAY, P. M. Turnover of cell wall polysaccharides in elongating pea stem segments. **Plant Physiology**, v. 53, p. 669-673, 1974b.

LASCHERMES, P. *et al.* Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular e General Genetic**, v. 261, p. 259-266, 1999.

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

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

LEROUXEL, O. *et al.* Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 6, p. 621-630, 2006.

LEROY, T. *et al.* Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 229-242, 2001.

LEUCCI, M. *et al.* Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 11, p. 1168-1180, 2008.

LI, X.; WENG, J.-K.; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 569-581, 2008.

LIMA, A. L. S. *et al.* Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.

LIMA, R. B. D. **Biossíntese de monolignóis em raízes de soja (*Glycine max* L. Merr.) tratadas com ácido cinâmico e derivados fenilpropenoides**. 2009. 63 (Mestre). Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

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

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, p. 409-414, 1961.

MANDAL, S. *et al.* Structural analysis of an arabinan isolated from alkaline extract of the endosperm of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Nata Karanja). **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 471-476, 2011.

MARGA, F.; GALLO, A.; HASENSTEIN, K. H. Cell wall components affect mechanical properties: studies with thistle flowers. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 792-797, 2003.

MARRACCINI, P. *et al.* RBCS1 expression in coffee: *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 85, 2011.

MASUDA, Y. Auxin-induced cell elongation and cell wall changes. **The Botanical Magazine, Tokio**, v. 103, p. 345-370, 1990.

MATÉ, J.; OOSTHYZEN, J., Eds. **Global warming and heat stress among western Australian mine, oil and gas workers**. 2012.

MATULOVÁ, M. *et al.* Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of *Coffea arabica* instant coffee powder. **Carbohydrate Research**, 2011.

MAZZAFERA, P.; CARVALHO, A. Produção e tolerância à seca de cafeeiros. **Bragantia**, v. 46, p. 403-415, 1987.

MCCANN, M. C. *et al.* Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. **The Plant Journal**, v. 5, p. 773-785, 1994.

MCNEIL, M. *et al.* The structure of plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 55, p. 64-68, 1975.

MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1586-1591, 1982.

MELLEROWICZ, E. J. *et al.* Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 239-274, 2001.

MIRNA HILAL, A. M. Z., GRACIELA PONESSA, HORTENSIA MORENO, AND EDDY M. MASSA. **Proteômica diferencial em clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico**. 2007. Departamento de Botânica, UFV, Viçosa.



- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 2006.
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.
- MONDEGO, J. M. *et al.* An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 30, 2011.
- MOORE, J. P. Response of the Leaf Cell Wall to Desiccation in the Resurrection Plant *Myrothamnus flabellifolius*. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 651-662, 2006.
- MOORE, J. P. *et al.* An Overview of the Biology of the Desiccation-tolerant Resurrection Plant *Myrothamnus flabellifolia*. **Annals of Botany**, v. 99, n. 2, p. 211-217, 2007.
- MOORE, J. P. *et al.* Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. **Physiologia Plantarum**, v. 134, n. 2, p. 237-245, 2008.
- MORGAN, J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual Review of Physiology**, v. 35, p. 299-319, 1984.
- MOURA, J. C. M. S. *et al.* Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 4, p. 360-376, 2010.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 651-681, 2008.
- MUSTARD, J.; RENAULT, S. Effects of NaCl on water relations and cell wall elasticity and composition of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 121, p. 265-271, 2004.

NAKAMURA, A. *et al.* Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 1155-1158, 2002.

NAZÁRIO, A. A. *et al.* Growth conilon coffee irrigated with saline water. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 7, n. 3, p. 178-195, 2010.

NEUMANN, P. M.; VOLKENBURGH, E. V.; CLELAND, R. E. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. **Plant Physiology**, v. 88, p. 233-237, 1988.

O'NEILL, M. A.; SELVENDRAN, R. R. Isolation and partial characterisation of xyloglucan from the cell walls of *Phaseolus coccineus*. **Carbohydrate Research**, v. 111, p. 239-255, 1983.

O'BRIEN, J. A. *et al.* Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. **Planta**, 2012.

ODA, Y.; FUKUDA, H. Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 38-44, 2011.

PALMER, J. D.; SOLTIS, D. E.; CHASE, M. W. The plant tree of life: an overview and some points of view. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1437-1445, 2004.

PARK, Y. B.; COSGROVE, D. J. Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient *xxt1/xxt2* mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 158, n. 1, p. 465-475, 2011.

PATTATHIL, S. *et al.* Changes in Cell Wall Carbohydrate Extractability Are Correlated with Reduced Recalcitrance of HCT Downregulated Alfalfa Biomass. **Industrial Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 1-5, 2012.

PAULY, M. *et al.* Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. **The Plant Journal**, v. 20, n. 6, p. 629-639, 1999.

PAULY, M. *et al.* Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. **Planta**, v. 212, p. 842-850, 2000.

- PEAUCELLE, A.; BRAYBROOK, S.; HÖFTE, H. Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2012.
- PENNELL, R. Cell walls: structures and signals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 504-510, 1998.
- PENNYCOOKE, J. C.; JONES, M. L.; STUSHNOFF, C. Down-Regulating - Galactosidase Enhances Freezing Tolerance in Transgenic Petunia. **Plant Physiology**, v. 133, n. 2, p. 901-909, 2003.
- PÉREZ-LÓPEZ, U. *et al.* Atmospheric CO<sub>2</sub> concentration influences the contributions of osmolyte accumulation and cell wall elasticity to salt tolerance in barley cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 1, p. 15-22, 2010.
- PILLING, E.; HÖFTE, H. Feedback from the wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 6, p. 611-616, 2003.
- PINHEIRO, H. A. *et al.* Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, v. 167, n. 6, p. 1307-1314, 2004.
- PIRO, G. *et al.* Exposure to water stress causes changes in the biosynthesis of cell wall polysaccharides in roots of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Plant Science**, v. 165, n. 3, p. 559-569, 2003.
- PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood Formation in Trees. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1513-1523, 2001.
- POPPER, Z. A. Widespread Occurrence of a Covalent Linkage Between Xyloglucan and Acidic Polysaccharides in Suspension-cultured Angiosperm Cells. **Annals of Botany**, v. 96, n. 1, p. 91-99, 2005.
- PRIVAT, I. *et al.* Differential regulation of grain sucrose accumulation and metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta) revealed through gene expression and enzyme activity analysis. **New Phytologist**, v. 178, n. 4, p. 781-797, 2008.

PROCTOR, M. Patterns of desiccation tolerance and recovery in bryophytes. **Plant Growth Regulation**, v. 35, p. 147-156, 2001.

PROCTOR, M. C. F.; LIGRONE, R.; DUCKETT, J. G. Desiccation Tolerance in the Moss *Polytrichum formosum*: Physiological and Fine-structural Changes during Desiccation and Recovery. **Annals of Botany**, v. 99, n. 1, p. 75-93, 2007.

RALPH, J. *et al.* Identification and synthesis of new ferulic acid dehydromers present in grass cell walls. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 23, p. 3485, 1994.

RECIO, E. Autolysis-like release of homogalacturonan from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cell walls. **Plant Science**, v. 164, n. 4, p. 579-588, 2003.

REIS, D. Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylans in their construction? **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, n. 9-10, p. 785-790, 2004.

REIS, D.; VIAN, B.; ROLAND, J.-C. Cellulose-glucuronoxylans and plant cell wall structure. **Micron**, v. 25, n. 2, p. 171-187, 1994.

REITER, W. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 6, p. 536-542, 2002.

RENAULT, S.; ZWIAZEK, J. J. Cell wall composition and elasticity of dormant and growing white spruce (*Picea glauca*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 323-327, 1997.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

ROMERO-ARANDA, R.; SORIA, T.; CUARTERO, J. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, v. 160, p. 265-272, 2001.

ROUBROEKS, J. P.; ANDERSSON, R.; AMAN, P. Structural features of (1 → 3), (1 → 4)- B-glucan and arabinoxylan fraction isolated from rye bran. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 3-11, 2000.

ROY, S. J.; TUCKER, E. J.; TESTER, M. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 232-239, 2011.

SAEMAN, J. F. *et al.* Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tappi Journal**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SAKURAI, N.; TANAKA, S.; KURAISHI, S. Changes in wall polysaccharides of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) Hypocotyls under water stress condition - I. Wall sugar composition and growth as affected by water stress. **Plant Cell Physiology**, v. 28, p. 1051-1058, 1987a.

SAKURAI, N.; TANAKA, S.; KURAISHI, S. Changes in wall polysaccharides of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) Hypocotyls under water stress condition - II. Composition of pectic and hemicellulosic polysaccharides. **Plant Cell Physiology**, v. 28, p. 1059-1070, 1987b.

SAKURAI, N.; TANAKA, S.; KURAISHI, S. Changes in wall polysaccharides of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) Hypocotyls under water stress condition II. Composition of pectic and hemicellulosic polysaccharides. **Plant & cell Physiology**, v. 28, n. 6, p. 1059-1070, 1987c.

SANTOS, A. B. D. **Caracterização fisiológica e molecular da tolerância à seca e sua relação com o sistema radicular em espécies de *Coffea***. 2009. (Mestre). Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SANTOS, T. B. *et al.* Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 441-448, 2011.

SANTOS, T. B. D. **Expressão de três isoformas de galactinol sintase em plantas de *Coffea arabica* L. submetidas a estresses abióticos**. 2008a. (Mestre). Departamento de Genética, UEL, Londrina.

SANTOS, T. B. D. **Expressão de três isoformas de galactinol sintase em plantas de *Coffea arabica* L. submetidas a estresses abióticos**. 2008b. (Mestre). Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

SASIDHARAN, R.; VOESENEK, L. A. C. J.; PIERIK, R. Cell Wall Modifying Proteins Mediate Plant Acclimatization to Biotic and Abiotic Stresses. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 6, p. 548-562, 2011.

SAULNIER, L.; THIBAUT, J.-F. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 396-402, 1999.

SCHÄDEL, C. *et al.* Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 1-8, 2010.

SCHEIBLE, W.-R.; PAULY, M. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 3, p. 285-295, 2004.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263-289, 2010.

SCHMOHL, N.; HORST, W. J. Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 735-742, 2000.

SCHWEIKERT, C.; LISZAKAY, A.; SCHOPFER, P. Polysaccharide degradation by Fenton reaction- or peroxidase-generated hydroxyl radicals in isolated plant cell walls. **Phytochemistry**, v. 61, p. 31-35, 2002.

SEIFERT, G. J.; ROBERTS, K. The Biology of Arabinogalactan Proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, n. 1, p. 137-161, 2007.

SHEDLETZKY, E. *et al.* Cell wall structure in cells adapted to growth on the cellulose-synthesis inhibitor 2,6-dichlorobenzonitrile. **Plant Physiol**, v. 100, p. 120-130, 1992.

SHOPFER, P. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth. **The Plant Journal**, v. 28, p. 679-688, 2001.

SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, v. 5, p. 9-23, 1993.

SILVA, G. B. *et al.* Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2352-2360, 2011.

SIMONOVIĆ, J. *et al.* Anisotropy of cell wall polymers in branches of hardwood and softwood: a polarized FTIR study. **Cellulose**, 2011.

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

SUN, X. *et al.* Polysaccharide compositions of leaf cell walls of forage chicory (*Cichorium intybus* L.). **Plant Science**, v. 170, n. 1, p. 18-27, 2006.

SUZUKI, N.; MITLLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 45-51, 2006.

SWEET, W. J. *et al.* Altered synthesis and composition of cell wall of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves during expansion and growth-inhibiting water deficits. **Plant Cell Physiology**, v. 31, p. 407-414, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4th. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers., 2006. 764

TAJI, T. Comparative Genomics in Salt Tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-Related Halophyte Salt Cress Using *Arabidopsis* Microarray. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1697-1709, 2004.

TALBOTT, L. D.; RAY, P. M. Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides. Effects of auxin and turgor. **Plant Physiology**, v. 98, p. 369-379, 1992.

TALMADGE, K. W. *et al.* The structure of plant cell wall. **Plant Physiology**, v. 51, p. 158-173, 1973.

TARDIEU, F.; TUBEROSA, R. Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 2, p. 206-212, 2010.

TERRY, M. E.; JONES, R. L. Soluble cell wall polysaccharides released from pea stems by centrifugation. **Plant Physiology**, v. 68, p. 531-537, 1981.

THOMAZIELLO, R. A. *et al.* **Café arábica: cultura e técnicas de produção.** Meio Ambiente, 1995. 82

THOMPSON, D. S. How do cell walls regulate plant growth? **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 419, p. 2275-2285, 2005.

THOMPSON, J. E.; FRY, S. C. Evidence for covalente linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. **Planta**, v. 211, p. 275-286, 2000.

UNDERWOOD, W. The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2012.

URAHARA, T. *et al.* A B-(1-4)-xylosyltransferase involved in the synthesis of arabinoxylans in developing barley endosperms. **Physiologia Plantarum**, v. 122, n. 2, p. 169-180, 2004.

VIEIRA, L. G. E. *et al.* Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

VILKAS, E.; RADJABI-NASSAB, F. The glucomannan system from *Aloe vahombe* (*liliaceae*). III. Comparative studies on the glucomannan components isolated from the leaves. **Biochimie**, v. 68, p. 1123-1127, 1986.

VINCKEN, J.-P. *et al.* Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1579-1585, 1995.



VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 123-132, 2005.

VINOGRADOV, E.; WASSER, S. The structure of a polysaccharide isolated from *Inonotus levis* P. Karst. mushroom (Heterobasidiomycetes). **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 18, p. 2821-2825, 2005.

VORAGEN, A. G. J. *et al.* Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263-275, 2009.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 4, p. 203-209, 2004.

VRIESMANN, L. C.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 72-79, 2009.

WAHID, A. *et al.* Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, n. 3, p. 199-223, 2007.

WAHOME, P. K.; JESCH, H. H.; GRITTNER, I. Mechanisms of salt stress tolerance in two rose rootstocks: *Rosa chinensis* 'Major' and *R. rubiginosa*. **Scientia Horticulturae**, v. 87, p. 207-216, 2001.

WAKABAYASHI, K.; HOSON, T.; KAMISAKA, S. Osmotic stress suppresses cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in wheat coleoptiles. **Plant Physiology**, v. 113, p. 967-973, 1997.

WAKABAYASHI, K.; SOGA, K.; HOSON, T. Phenylalanine ammonia-lyase and cell wall peroxidase are cooperatively involved in the extensive formation of ferulate network in cell walls of developing rice shoots. **Journal of Plant Physiology**, 2011.

WANG, S. *et al.* Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2011.

- WANG, W.; VINO CUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003.
- WEBB, M. A.; ARNOTT, H. J. Cell wall conformation in dry seeds in relation to the preservation of structural integrity during desiccation. **American Journal of Botany**, v. 69, p. 1657-1668, 1982.
- WEISER, R. L.; WALLNER, S. J.; WADDELL, J. W. Cell wall and extensin mRNA changes during cold acclimation of *Pea Seedlings*. **Plant Physiology**, v. 93, p. 1021-2026, 1990.
- WENZEL, G. E.; CORRÊA, J. B. C. Fractionation of the hemicellulose and structural analysis of 4-O-Methylglucuronoxylan. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 49, p. 605-613, 1977.
- WHITNEY, S. E. C. *et al.* Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 121, p. 657-663, 1999.
- WILLATS, W. G. T. *et al.* Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 9-27, 2001.
- WILSON, R. H. *et al.* The Mechanical Properties and Molecular Dynamics of Plant Cell Wall Polysaccharides Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. **Plant Physiology**, v. 124, p. 397-405, 2000.
- WOLF, S.; GREINER, S. Growth control by cell wall pectins. **Protoplasma**, 2012.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetilation. In: (Ed.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.2, 1963a. p.211.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydrate. In: (Ed.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.2, 1963b. p.65.
- WU, Y.; COSGROVE, D. J. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1543-1553, 2000.

WU, Y. *et al.* Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increase in cell-wall extensin activity, and wall susceptibility to expansins. **Plant Physiology**, v. 111, p. 765-772, 1996.

WU, Y. *et al.* Root growth maintenance at low water potentials. **Plant Physiology**, v. 106, p. 607-615, 1994.

YADAV, S. *et al.* Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, p. 667-685, 2011.

YANG, J.; ZHOU, D.; LIANG, Z. A new polysaccharide from leaf of *Ginkgo biloba* L. **Fitoterapia**, v. 80, n. 1, p. 43-47, 2009.

YANG, J. L. *et al.* Cell Wall Polysaccharides Are Specifically Involved in the Exclusion of Aluminum from the Rice Root Apex. **Plant Physiology**, v. 146, n. 2, p. 602-611, 2007.

YANG, K. *et al.* Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in *Chinese cabbage*. **Plant Science**, v. 171, n. 1, p. 175-182, 2006.

YANG, Z. B. *et al.* Alteration of cell-wall porosity is involved in osmotic stress-induced enhancement of aluminium resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 12, p. 3245-3258, 2010.

YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, 2011.

YE, Z.-H. *et al.* Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase and lignin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1177-1185, 2001.

YORK, W.; ONEILL, M. Biochemical control of xylan biosynthesis — which end is up? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 258-265, 2008.

ZABLACKIS, E. *et al.* Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Leaves. **Plant Physiology**, v. 107, p. 1129-1138, 1995.

ZANDLEVEN, J. *et al.* Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1219-1226, 2007.

ZHANG, B. *et al.* Water-deficit and high temperature affected water use efficiency and arabinoxylan concentration in spring wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 2, p. 263-269, 2010a.

ZHANG, G.-L. *et al.* Effects of High Temperature Stress on Microscopic and Ultrastructural Characteristics of Mesophyll Cells in Flag Leaves of Rice. **Rice Science**, v. 16, n. 1, p. 65-71, 2009a.

ZHANG, G. *et al.* Effects of High Temperature Stress on Microscopic and Ultrastructural Characteristics of Mesophyll Cells in Flag Leaves of Rice. **Rice Science**, v. 16, n. 1, p. 65-71, 2009b.

ZHANG, M.-P. *et al.* Changes in chloroplast ultrastructure, fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 277-285, 2010b.

ZHANG, Y. J. *et al.* Effect of water stress on leaf photosynthesis, chlorophyll content, and growth of oriental lily. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, n. 5, p. 844-850, 2011.

ZHEN, A. *et al.* Effects of salt-tolerant rootstock grafting on ultrastructure, photosynthetic capacity, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging system in chloroplasts of cucumber seedlings under NaCl stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, 2011.

ZHONG, H.; LÄUCHLI, A. Changes of cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, p. 773-778, 1993.

ZHONG, H.; LÄUCHLI, A. Incorporation of [<sup>14</sup>C]glucose into cell wall polysaccharides of cotton roots: effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub>. **Plant Physiology**, v. 88, p. 511-514, 1998.

ZHONG, R.; YE, Z.-H. **Secondary Cell Walls**. Plant Science. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd 2009.

ZHOU, Y. *et al.* The use of natural abundance stable isotopic ratios to indicate the presence of oxygen-containing chemical linkages between cellulose and lignin in plant cell walls. **Phytochemistry**, v. 71, n. 8-9, p. 982-993, 2010.

ZWIAZEK, J. J. Cell changes in white spruce (*Picea Glauca*) needles subjected to repeated drought stress. **Physiologia Plantarum**, v. 82, p. 513-518, 1991.

**ANEXOS**

LIMA, R. B. dos Santos, T. B., Vieira, L. G. E., Ferrarese, M. d. L. L., Ferrarese-Filho, O., Donatti, L., Boeger, M. R. T., Petkowicz, C. L. d. O. Heat stress causes alterations in the cell-wall polymers and anatomy of coffee leaves (*Coffea arabica* L.). **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 135-143, 2013.