

# **Análise das alterações proteómicas em *Coffea canephora* e *Coffea arabica* induzidas pelo aumento da temperatura**

**David Belchior Clemente**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Agronómica**

Orientador(es): Isabel Marques (UL)

Ana Isabel Ribeiro (ISA/UL)

**(Versão Provisória)**

Outubro de 2021

## Agradecimentos

Às minhas orientadoras Professora Isabel Marques e Professora Ana Isabel Ribeiro, pelo apoio quase incansável e pela ajuda intelectual para me socorrer neste tema tão complexo.

Agradecer também aos meus colegas de trabalho e empregadores pela paciência e ajuda que me facultaram para realizar esta dissertação da melhor maneira possível.

À minha namorada pelo companheirismo a todas as horas e por ser a pessoa que mais acreditou na minha conclusão deste ciclo.

Aos meus pais pelo suporte quer sentimental, quer financeiro que me deram ao longo desta longa caminhada.

**Apoio Financeiro:** Este trabalho recebeu financiamento do programa de investigação e inovação Horizonte 2020 da União Europeia (convenção de subvenção n.º 727934, projeto BreedCAFS) e de fundos nacionais da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. (FCT), Portugal, através do projeto PTDC / ASP-AGR / 31257/2017, e das unidades de investigação UIDB / 00239/2020 (CEF).

## Resumo

O café é uma das culturas mais consumidas e produzidas no mundo. As alterações climáticas são um desafio à sua sustentabilidade causando quebras significativas desta cultura a temperaturas elevadas. Compreender o efeito do stress térmico no café e quais os mecanismos de resiliência da planta face a este fator de stress é essencial para obter um melhoramento da espécie que mitigue os impactos negativos da temperatura na indústria cafeeira.

As espécies de café *Coffea canephora* e *C. arabica* são aquelas que possuem maior representatividade a nível global. Neste contexto, o estudo realizado pretende compreender a resposta proteómica de dois genótipos destas espécies à exposição a temperaturas elevadas e muito elevadas (respetivamente 37°C e 42°C). Assim, recorrendo a uma espetrometria de massa de alta resolução obteve-se os péptidos expressos por estas plantas após os diferentes tratamentos térmicos. Realizou-se uma identificação proteica e uma posterior análise funcional de modo a compreender que proteínas diferenciais foram obtidas em cada ensaio térmico e para cada genótipo.

Ambas as espécies apresentaram uma redução na abundância de proteínas com o aumento da temperatura, sendo a maior repressão verificada a 42°C, e particularmente em *C. arabica*. Em termos da resposta fotossintética, observaram-se respostas proteicas semelhantes em *C. arabica* e *C. canephora*, tendo sido verificado até aos 37°C uma resposta positiva por parte dos dois genótipos, ao contrário do registado noutros genótipos de café. Uma análise complementar permitiu a identificação de várias *Heat Shock Proteins* que aumentaram de abundância com o aumento de temperatura, em ambos os genótipos, sugerindo a existência de uma maquinaria proteica de resiliência térmica nestas plantas de café, em específico em *C. canephora*. Os resultados obtidos constituem os primeiros dados referentes ao proteoma destas variedades de café, e poderão servir no futuro, a novos programas de estudo e de possível melhoramento do café.

**Palavras-chave:** café; alterações climáticas; análise funcional; temperaturas elevadas; proteómica

## Abstract

Coffee is one of the most consumed and produced crops in the world. Climate changes have challenged the sustainability of this crop, which shows significant declines at high temperatures. Thus, understanding the effect of heat stress on coffee and what the plant's resilience mechanisms are in relation to this stress factor is essential to obtain an improvement of the species that mitigates the negative impacts of temperature on the coffee industry.

The coffee species *Coffea canephora* and *C. arabica* are those with the greatest global representation. Therefore, the study aimed to understand the proteomic response of two genotypes of these species to exposure to high and very high temperatures (37°C and 42°C, respectively). Thus, using a high-resolution mass spectrometry it was possible to obtain the peptides expressed by these plants after different heat treatments. Protein identification and subsequent functional analysis were performed in order to understand which differential proteins were obtained in each thermal assay and for each genotype.

Both species showed a reduction in protein abundance with increasing temperature, with the greatest repression observed at 42°C, and particularly in *C. arabica*. In terms of the photosynthetic response by the plants, similar protein responses were observed in *C. arabica* and *C. canephora*, with a positive response by both genotypes being verified up to 37°C, contrary to what was registered in other coffee genotypes. A complementary analysis allowed the identification of several Heat Shock Proteins, which increased in abundance with increasing temperature, in both genotypes. This suggests the existence of a thermal resilience protein machinery in these coffee plants, specifically in *C. canephora*. The results obtained in this study constitute the first data regarding the proteome of these coffee varieties, and may be used in the future for new programs of study and possible improvement of coffee.

**Keywords:** coffee; climate changes; functional analysis; high temperatures; proteomics

# Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>10</b>
1.1. Crescimento populacional e demanda de alimentos .....	10
1.2. Impacto das alterações climáticas na produção de alimentos .....	11
1.3. Importância socioeconómica do café .....	11
1.4. Efeitos do aumento da temperatura na planta do café .....	13
1.5. Respostas do café face aos impactes climáticos .....	14
1.6. Importância da proteómica na luta contra os efeitos dos impactes climáticos .....	16
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos .....	18
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1. Plantas em estudo e condições de crescimento.....	19
3.2. Implementação de Stress Térmico.....	19
3.3. Extração de Proteínas .....	19
3.4. Espectrometria de massa de alta resolução .....	20
3.5. Identificação de proteínas e quantificação <i>label free</i> .....	21
3.6. Identificação de proteínas diferencialmente diferentes à temperatura.....	23
4.1. Principais características do proteoma de <i>Coffea canephora</i> e <i>Coffea arabica</i> .....	24
4.2. Análise da abundância de proteínas diferenciais presentes em cada tratamento para <i>Coffea canephora</i> e <i>Coffea arabica</i> . .....	27
4.3. Ontologia das proteínas diferenciais .....	33
4.3.1 Ontologia das proteínas diferenciais mais abundantes em <i>C.canephora</i> .....	33
4.3.2 Ontologia das proteínas diferenciais menos abundantes em <i>C. canephora</i> .....	35
4.3.3. Ontologia das proteínas diferenciais mais abundantes em <i>C. arabica</i> .....	37
4.3.4. Ontologia das proteínas diferenciais menos abundantes em <i>C. arabica</i> .....	40
4.4. Análise específica das proteínas associadas a respostas a fatores de stress relacionadas com calor por parte da planta do café nas variedades em estudo.....	42

<b>5. Discussão</b> .....	44
5.1. Relevância da proteômica na cultura do café.....	44
5.2. Caracterização e funcionalidade do proteoma da folha de café .....	44
5.3. Respostas diferenciais à temperatura pelos genótipos <i>C. canephora</i> e <i>C. arabica</i> ....	45
5.4. Presença de proteínas responsáveis por respostas diretas ao stress térmico .....	47
5.5 Importância destes resultados para a indústria do café.....	49
6. Conclusões.....	51
<b>7. Bibliografia</b> .....	52

## Lista de Figuras

<b>FIGURA 1-</b> RESPOSTA DA PLANTA AOS FATORES DE STRESS ABIÓTICO. (ADAPTADO ORNAMENTAIS & NATIVAS, 2008).	16
<b>FIGURA 2 -</b> TIPOS E APLICAÇÕES DE ESTUDOS EM PROTEÓMICA EM DIFERENTES SISTEMAS BIOLÓGICOS. (ADAPTADO VINOCUR & ALTMAN, 2005).	17
<b>FIGURA 3-</b> ETAPAS DE IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DO PROCESSO DE ESPECTROMETRIA <i>TANDEM</i> (ADAPTADO SEQUEIRA ET AL, 2017).	20
<b>FIGURA 4-</b> FLUXOGRAMA GENERALIZADO DE UMA ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO PROTEÓMICA “LABEL FREE” (ADAPTADO MEGGER ET AL., 2013).	22
<b>FIGURA 5-</b> VALORES MÉDIOS DA EXPRESSÃO PROTEICA DE CADA EM <i>COFFEA CANEPHORA</i> .	25
<b>FIGURA 6-</b> VALORES MÉDIOS DA EXPRESSÃO PROTEICA DE CADA PROTEÍNA EM <i>COFFEA ARABICA</i> .	25
<b>FIGURA 7-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MAIS REPRESENTATIVAS NOS GENOMAS DAS DUAS VARIEDADES.	27
<b>FIGURA 8-</b> ANÁLISE COMPARATIVA DO NÚMERO DE PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES COM O AUMENTO DE TEMPERATURA FACE À TEMPERATURA CONTROLO EM <i>C. CANEPHORA</i> .	28
<b>FIGURA 9-</b> ANÁLISE COMPARATIVA DO NÚMERO DE PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES COM O AUMENTO DE TEMPERATURA FACE À TEMPERATURA CONTROLO EM <i>C. CANEPHORA</i> .	28
<b>FIGURA 10-</b> ANÁLISE COMPARATIVA REFERENTE AO NÚMERO DE PROTEÍNAS MENOS E MAIS ABUNDANTEMENTE EXPRESSAS FACE AO CONTROLO, EM <i>C. CANEPHORA</i> .	29
<b>FIGURA 11-</b> ANÁLISE COMPARATIVA DO NÚMERO DE PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES COM O AUMENTO DE TEMPERATURA FACE À TEMPERATURA CONTROLO EM <i>C. ARABICA</i> .	30
<b>FIGURA 12-</b> ANÁLISE COMPARATIVA DO NÚMERO DE PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES COM O AUMENTO DE TEMPERATURA FACE À TEMPERATURA CONTROLO EM <i>C. ARABICA</i> .	30
<b>FIGURA 13-</b> ANÁLISE COMPARATIVA REFERENTE AO NÚMERO DE PROTEÍNAS MENOS E MAIS ABUNDANTEMENTE EXPRESSAS FACE AO CONTROLO, EM <i>C. ARABICA</i> .	31
<b>FIGURA 14-</b> SÍNTESE COMPARATIVA DA MENOR E MAIOR ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS EM <i>C. CANEPHORA</i> E <i>C. ARABICA</i> APÓS OS DISTINTOS TRATAMENTOS DE CALOR.	32
<b>FIGURA 15-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES EM <i>C. CANEPHORA</i> A 37°C EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	33
<b>FIGURA 16-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES EM <i>C. CANEPHORA</i> A 42°C EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	34
<b>FIGURA 17-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES EM <i>C. CANEPHORA</i> NO PERÍODO DE RECUPERAÇÃO EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	34

<b>FIGURA 18-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES EM <i>C. CANEPHORA</i> A 37°C EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	35
<b>FIGURA 19-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES EM <i>C. CANEPHORA</i> A 42°C EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	36
<b>FIGURA 20-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES EM <i>C. CANEPHORA</i> NO PERÍODO DE RECUPERAÇÃO EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	37
<b>FIGURA 21-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES EM <i>C. ARABICA</i> A 37°C EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	38
<b>FIGURA 22-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES EM <i>C. ARABICA</i> A 42°C EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	39
<b>FIGURA 23-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES EM <i>C. ARABICA</i> NO PERÍODO DE RECUPERAÇÃO EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	39
<b>FIGURA 24-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES EM <i>C. ARABICA</i> A 37°C EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	40
<b>FIGURA 25-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES EM <i>C. ARABICA</i> A 42°C EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	41
<b>FIGURA 26-</b> CATEGORIZAÇÃO ONTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES EM <i>C. ARABICA</i> NO PERÍODO DE RECUPERAÇÃO EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLO A 25°C.	42
<b>FIGURA 27-</b> CONTABILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DIRETAMENTE RELACIONADAS COM RESPOSTAS DA PLANTA AO STRESS TÉRMICO NAS VARIEDADES <i>C. ARABICA</i> E <i>C. CANEPHORA</i> APÓS OS DISTINTOS TRATAMENTOS DE CALOR.	43

## Lista de Quadros

<b>QUADRO 1</b> - QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EXPRESSAS PARA A ESPÉCIE <i>COFFEA CANEPHORA</i> .	24
<b>QUADRO 2</b> - QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EXPRESSAS PARA A ESPÉCIE <i>COFFEA ARABICA</i> .	24
<b>QUADRO 3</b> - LISTA DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES EM <i>C. CANEPHORA</i> COMPARATIVAMENTE A <i>C. ARABICA</i> (DEFINIDAS POR CONTRIBUÍREM PARA 20% DO NSAF CUMULATIVO PARA AMBAS AS VARIEDADES) E RESPETIVAS CATEGORIZAÇÕES ONTOLÓGICAS GERAIS.	26

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – *Bovine Serum Albumine*

CH<sub>3</sub>CN – Acetonitrila

CL153 – Clone 153 de *C. canephora*

CLR - *Coffee Leaf Rust*

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

CWD - *Coffee Wilt Disease*

DA - Massa de proteínas

DAPS – Proteínas diferencialmente abundantes

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DWN – Abreviatura para *down*

FDR – *False discovery rate*

GO – Ontologia do gene

HCOOH – Ácido metanoico

HF – *High Frequency*

HSPs – *Heat Shock Proteins*

LDS - *Lithium dodecyl sulfate*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NSAF - Fator de abundância espectral normalizado

PS II – Fotossistema II

PSM – Correspondência péptido-espectro

PTMs - Modificações pós-traducionais

REC – Período de recuperação

RFOs - *Raffinose Family Oligosaccharides*

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – Espécies reativas ao oxigênio

# 1. Introdução

## 1.1. Crescimento populacional e demanda de alimentos

O crescimento populacional global que se tem verificado ao longo das últimas décadas acarreta consequências diretas para a economia mundial, tendo repercussões na tendência de produção de alimentos e na escala de produção dos mesmos (Crist, Mora, & Engelman, 2017). A procura de produtos agrícolas tem aumentado cada vez mais nos dias de hoje, crescendo a passos largos devido também às mudanças nos padrões de consumo por parte da população. É requerido, portanto, um acréscimo de produção agrícola por parte dos países onde esta produção é mais reduzida, nomeadamente nos países em desenvolvimento (van Beek et al., 2010).

Até 2050 estima-se que a população mundial alcance 9.1 biliões, o que mostra um acréscimo de cerca de 34% quando comparado com os valores reportados pelas Nações Unidas no ano de 2009 (FAO, 2009). Desde 1950 foi registado um crescimento populacional de cerca de 4 biliões de pessoas, mas é esperado que os países desenvolvidos estagnem ou mesmo retraiam o seu crescimento populacional comparativamente aos países em desenvolvimento (Bongaarts, 2009). O “boom” populacional ocorre predominantemente em países em desenvolvimento como África, Ásia (excluindo o Japão, Austrália e Nova Zelândia), e América latina, onde a população está projetada para crescer dos 5.3 para os 7.9 biliões entre 2005 e 2050 (Bongaarts, 2009). Neste contexto, a produção de comida a nível mundial terá de aumentar 70% e a produção de cereais terá de crescer a um ritmo frenético de modo a produzir os 3 biliões de toneladas esperadas para o ano de 2050 (FAO, 2009).

O crescimento populacional exponencial traz um estado de instabilidade alimentar, sendo que esta induz uma exploração excessiva dos recursos ambientais, o que pode levar a danos irreparáveis no futuro próximo (Singh et al., 2016). As alterações climáticas também representam um risco elevado para a segurança alimentar mundial (Ray et al., 2019). Os impactos mais visíveis das alterações climáticas ocorrerão ao nível das perdas de produtividade e de uma maior frequência de eventos climáticos extremos (FAO, 2009).

## 1.2. Impacto das alterações climáticas na produção de alimentos

Mesmo não sendo os principais precursores das mudanças climáticas, os países em desenvolvimento serão os que sofrerão mais com estas mudanças (Casey et al., 2019). Os países onde a receita é média ou baixa serão os mais afetados dado que milhões de pessoas dependem exclusivamente da agricultura como modo de subsistência. A crescente variabilidade na precipitação irá prejudicar e reduzir a produtividade de culturas extremamente importantes nestes países menos desenvolvidos (United Nations, 2015), dado que estas culturas geralmente preferem uma exposição a temperaturas relativamente estáveis (Casal & Balasubramanian, 2019). As alterações climáticas irão também afetar de forma negativa, a proporção de terra arável disponível no futuro devido à degradação do solo, a qual irá também impactar os sistemas de produção agrícola (United Nations, 2015).

Existe uma preocupação crescente por este tema com o intuito de colmatar as necessidades mundiais em termos de produção de alimentos, e deste modo reduzir a fome a nível mundial (Jie et al., 2002). É estimado que cerca de 2 biliões de hectares de terra arável já se tenham degradado, o que representa cerca de 22% da totalidade da mesma. Existem diversas formas de degradar o solo, quer seja por má gestão agrícola, excesso de pasto, ou desflorestação, entre outras (Jie et al., 2002). Devido a esta perda de solo arável foi estimado que cerca de 13% da oferta agrícola mundial foi também perdida nas últimas cinco décadas (United Nations, 2015).

## 1.3. Importância socioeconómica do café

O café (género *Coffea* L.) tem uma importância crucial no mercado global, sendo a segunda bebida mais consumida, seguida da água (Czarniecka-Skubina, Pielak, Sałek, Korzeniowska-Ginter, & Owczarek, 2021). Trata-se de um dos mais valiosos produtos primários comercializados no mundo sendo apenas superado pelo valor do petróleo. O seu consumo anual encontra-se perto dos 500 bilhões de doses de café, sendo que esta demanda irá aumentar no futuro (Butt & Sultan, 2011). O problema surge quando a produção mundial de café depende também ela de fatores abióticos, assim, tentar assegurar a máxima produção que supra a necessidade do mercado global torna-se um desafio.

Existem mais de 124 espécies no género *Coffea* mas as duas mais importantes a nível económico e que apresentam uma maior área de produção de cultivares são a *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (De Camargo & De Camargo, 2001; De Luca et al., 2016; Graaff, 1986;

Hamon et al., 2017; Kalschne et al., 2018; Krishnan & Boot, 2014; Lambot et al., 2017). Existem diferenças consideráveis entre estas espécies quer em termos de sabor, aparência ou mesmo em teores de cafeína (Butt & Sultan, 2011). *Coffea canephora* (café Robusta) trata-se de uma variedade nativa da África Central, Golfo da Guiné e Uganda, e proveniente de florestas equatoriais com baixas a médias altitudes (entre 250 e 1500 metros). Já a espécie *Coffea arabica* (café Arabica) é originária da estreita região do Sudoeste da Etiópia e o Sul do Sudão, desenvolvendo-se em florestas tropicais montanhosas, entre os 1200 e os 1950 metros (Lambot et al., 2017). A produção mundial de café recai essencialmente sobre estas duas espécies, sendo que a cota comercial do café Arabica representa cerca de 60% das trocas comerciais globais totais, ficando assim a Robusta com os restantes 40% (DaMatta & Cochicho Ramalho, 2006; Davis et al., 2019). É ainda referido que a qualidade do café produzido pelos grãos da variedade Robusta é considerada inferior, dado que esta apresenta um maior teor de cafeína (CTA, 2003).

As mudanças climáticas referidas anteriormente irão ter um drástico efeito nalgumas regiões conhecidas como centros de produção do café, condicionando assim as formas de rendimento de quem nelas habita (Fischer, Shah, & Velthuisen, 2002). No entanto, esta possível escassez de café é contrastada com a atual procura de café de excelente qualidade e de origens sustentáveis, que tem vindo a aumentar nos últimos anos (Leal Filho et al., 2011). A demanda deste produto pelos consumidores passa por melhores aromas e sabores, assim como pelo café de alta qualidade, sendo portanto estes parâmetros essenciais para o seu sucesso económico (Lambot et al., 2017).

Existem diversos fatores que ameaçam a sustentabilidade do café, apesar do crescimento do setor a nível global (Davis et al., 2019). As mudanças climáticas incluindo temperaturas extremas, secas severas e prolongadas representam o maior fator de risco (Moat et al., 2017), em conjunto com a disseminação de fungos como a Ferrugem do Café, ou CLR (*Coffee Leaf Rust*) (Avelino et al., 2015; Hindorf & Omondi, 2011). Para além desta doença, também a murchidão do café, conhecida como CWD (*Coffee Wilt Disease*) na espécie Robusta tem uma grande preponderância em África (Cristancho et al., 2016). Os restantes fatores estão associados com outras pragas e doenças que começam a ganhar espaço e a emergir como problemas diretos à produção de café a nível global, assim como os fatores económicos e sociais relacionados com os mercados (Davis et al., 2019). É importante perceber que os ajustes nos sistemas de produção de café requerem muito tempo (devido à planta do café se tratar de uma árvore) (Farah & Dos Santos, 2015) quer para os agricultores, quer para os parceiros comerciais para fazer mudanças significativas (Leal Filho et al., 2011). Uma decisão efetuada no dia de hoje por ambas as partes representa uma alteração efetiva num prazo de 8 a 15 anos, onde por essa altura o clima já se terá alterado

(Leal Filho et al., 2011). É, portanto, essencial criar medidas de mitigação efetivas e que possam rapidamente ser implementadas no terreno.

#### **1.4. Efeitos do aumento da temperatura na planta do café**

As plantas por vezes encontram ao longo do seu ciclo de vida condições desfavoráveis para o seu desenvolvimento. Diversos fatores climáticos como as secas, as amplitudes térmicas muito altas e por vezes, até a contaminação do solo por grandes concentrações de sal, são fatores stressantes para a planta, que limitam o seu crescimento, e também o seu potencial de produção. Isto implica, em grande escala, a distribuição geográfica das espécies pelo globo terrestre (Krasensky & Jonak, 2012). O stress ambiental afeta as estruturas celulares da planta e condiciona funções fisiológicas chave (Larcher, 2003).

As temperaturas extremas afetam vários processos metabólicos e celulares nas plantas do café, assim como o seu crescimento, a sobrevivência, o seu potencial produtivo e consequentemente o seu potencial comercial (DaMatta & Cochicho Ramalho, 2006). Embora a planta do café possua diversos mecanismos de aclimação de modo a poder suportar e ultrapassar algum stress, esta capacidade de resposta varia entre espécies, cultivares e por vezes de planta para planta (Silva et al., 2004). As temperaturas elevadas causam disrupções no metabolismo do cafeeiro (DaMatta & Cochicho Ramalho, 2006) afetando drasticamente o sistema fotossintético (Larcher, 2003). As temperaturas elevadas causam um distúrbio na homeostase celular (Brosché et al., 2014; Hasanuzzaman, Nahar, Alam, Roychowdhury, & Fujita, 2013). A fotossíntese tem um papel fundamental no desenvolvimento das folhas e dos frutos do cafeeiro, sendo que temperaturas excessivas causam crescimentos abruptos, que conciliados aos recursos fotossintéticos disponíveis podem causar o aparecimento de frutos de calibres menores e folhas menores, que por sua vez irão condicionar a taxa de fotossíntese da planta (Lawlor, 2001).

Vários autores têm debatido sobre quais as temperaturas que condicionam o desenvolvimento do cafeeiro, sendo que a gama de temperaturas mais indicada para a correta produção, se situa entre os 18°C e os 23°C (Mesquita et al., 2016). DaMatta & Cochicho Ramalho (2006) compilam toda esta informação e apresentam argumentos que indicam que apenas a temperatura excessiva tem um efeito negativo direto na fotossíntese e no desenvolvimento da planta. Os autores referem que a planta do café apresenta uma tolerância superior à manifestada na literatura clássica que assume as temperaturas moderadas como causadoras de danos. Neste sentido, áreas dominadas por climas tropicais teriam baixa

produtividade de café, sendo que nos mesmos facilmente se observam temperaturas superiores a 30°C durante uma grande parte do dia. É ainda verificado que os maiores índices de produtividade do cafeeiro são verificados na “estação quente” (Silva et al., 2004), pelo que se suspeita que o café realmente possa ter alguma tolerância às temperaturas elevadas. Os casos onde ocorrem danos na planta são essencialmente situações onde a exposição solar e a absorção da energia luminosa é muito superior àquela que é utilizada durante o processo de fotossíntese. Ocorre então, por vezes, uma sobrecarga de energia nas folhas que pode induzir um aumento de temperatura até aos 40°C ou superiores (Maestri, Barros, & Rena, 2001). Apenas nestas condições seriam verificados efeitos das altas temperaturas, como as cloroses e as queimaduras das folhas e por vezes a morte da planta (DaMatta & Cochicho Ramalho, 2006). A um nível mais profundo são verificados danos em todo o mecanismo fotossintético, sendo estes mais acentuados no transporte de eletrões e no fotossistema 2 (PS II) (Nunes, Ramalho, & Dias, 1993).

No entanto, é importante mencionar que estudos recentes revelam que diversos estágios de desenvolvimento floral, especialmente estágios avançados, são extremamente sensíveis a stress provocado por calor (Smith & Zhao, 2016). Fases como a meiose dos grãos de pólen das células mãe, libertação de pólen pela anteras, antese e fertilização são extremamente sensíveis ao calor. Os órgãos masculinos são muito mais suscetíveis à esterilidade quando comparados com os femininos. É estudado que esta esterilidade pode ser causada, entre outras razões, pela proteína de resposta ao choque térmico HSP40, que causa um encurtamento no comprimento nos tubos de pólen (Smith & Zhao, 2016). É, portanto, essencial conhecer como as temperaturas elevadas afetam o café de forma a desenvolver estratégias de mitigação.

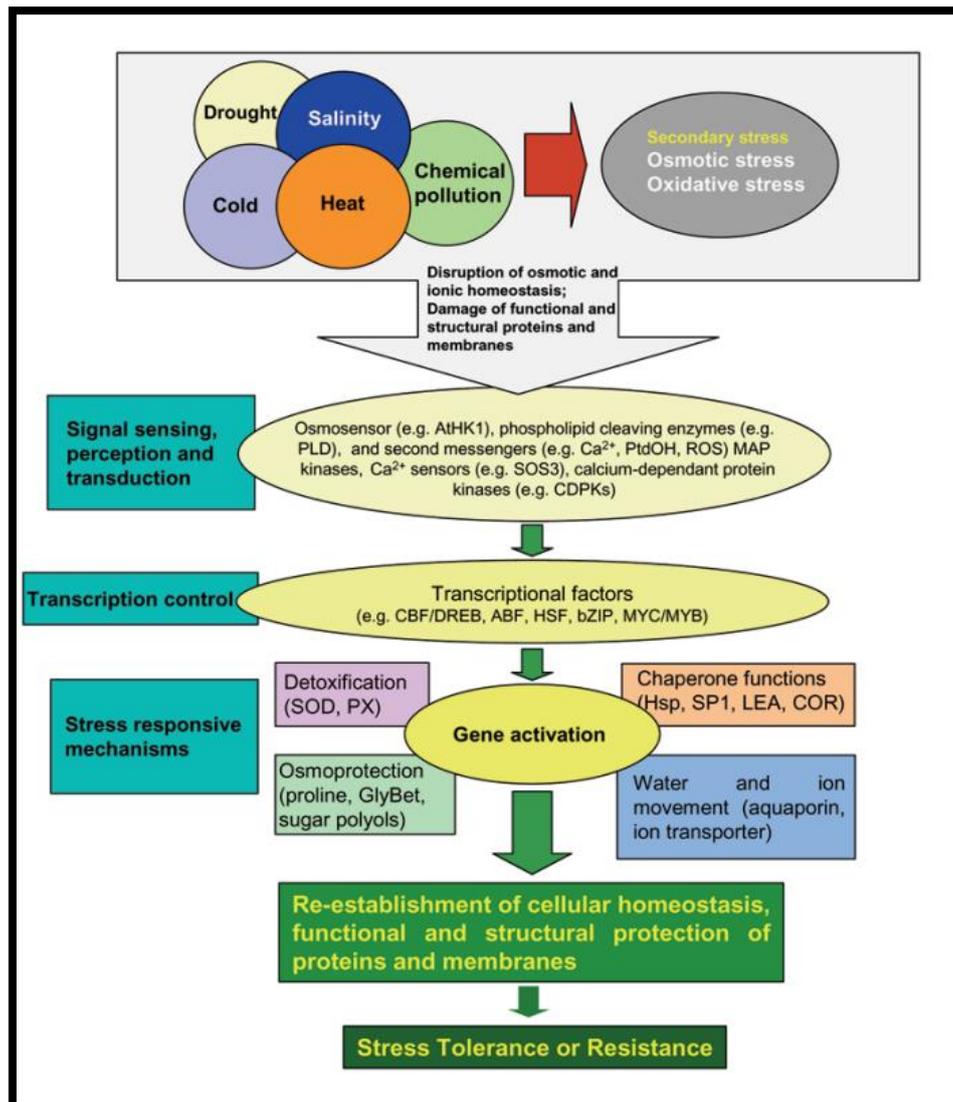
## **1.5. Respostas do café face aos impactes climáticos**

O papel das proteínas na resposta ao stress é crucial devido a dois fatores: as proteínas constituem a parte ativa da formação de novos fenótipos de plantas através da regulação de características fisiológicas adaptadas ao ambiente circundante (Zipfel & Oldroyd, 2017); e, as mesmas são as principais protagonistas na execução de mecanismos celulares, assim como na manutenção da homeostase celular (Ingolia, 2014). Na planta do café, as proteínas são passíveis de apresentar uma perda significativa da sua atividade quando a planta se encontra sobre algum tipo de stress, o que pode acarretar consequências graves a nível fisiológico, como a inibição da fotossíntese, disfunção metabólica e por último, dano

causado a estruturas celulares que conseqüentemente afetam o crescimento da planta (Larcher, 2003; Munns & Tester, 2008).

Muitas vezes é observada uma resposta ,por parte das plantas, ao stress, sendo categorizada em dois tipos: evitar o stress e tolerar o stress (J. Levitt, 1980). As plantas evitam o stress através de uma vasta gama de mecanismos de proteção que permite prevenir os impactos negativos do fator stressante. Por outro lado, na tolerância ao stress, há um potencial/capacidade da planta em se aclimatar a uma dada condição de stress (Krasensky & Jonak, 2012). Por exemplo, quando as plantas são submetidas a situações de stress ambiental, como seca, salinidade, baixa e alta temperatura, luz intensa e excesso de ozono ou CO<sup>2</sup>, as mesmas ativam um conjunto de diversos mecanismos fisiológicos, metabólicos e de defesa, por forma a sobreviver e a crescer de maneira sustentável (Valliyodan & Nguyen, 2006). Em termos celulares as respostas mais recorrentes são o ajustamento do sistema membranar, as modificações na arquitetura das paredes celulares, assim como as mudanças no ciclo celular e na divisão celular (Ceccon, 2008). Diferentes stresses ambientais causam muitas vezes vias de sinalização celular e respostas celulares semelhantes (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000), como a produção de proteínas de stress, regulação de antioxidantes e acumulação de solutos (Bohnert & Cushman, 2000).

A resposta da planta relativamente aos fatores de stress pode ser bastante complexa pois envolve, para além de diversos genes, uma vasta gama de mecanismos moleculares (Fig. 1) (Ornamentais & Nativas, 2008). O mais importante deste processo é perceber como se dividem os tipos de genes-resposta expressos. Estes estão catalogados em três diferentes categorias: os envolvidos com as cascatas de sinais e com o controlo transcricional; aquelas que atuam diretamente na proteção das membranas e proteínas e aquelas que estão relacionadas com a água, assim como a absorção de iões e transporte (Wang, Vinocur, & Altman, 2003). Neste contexto, a proteómica permite identificar a ativação e a regulação de diversas proteínas relacionadas com o stress.

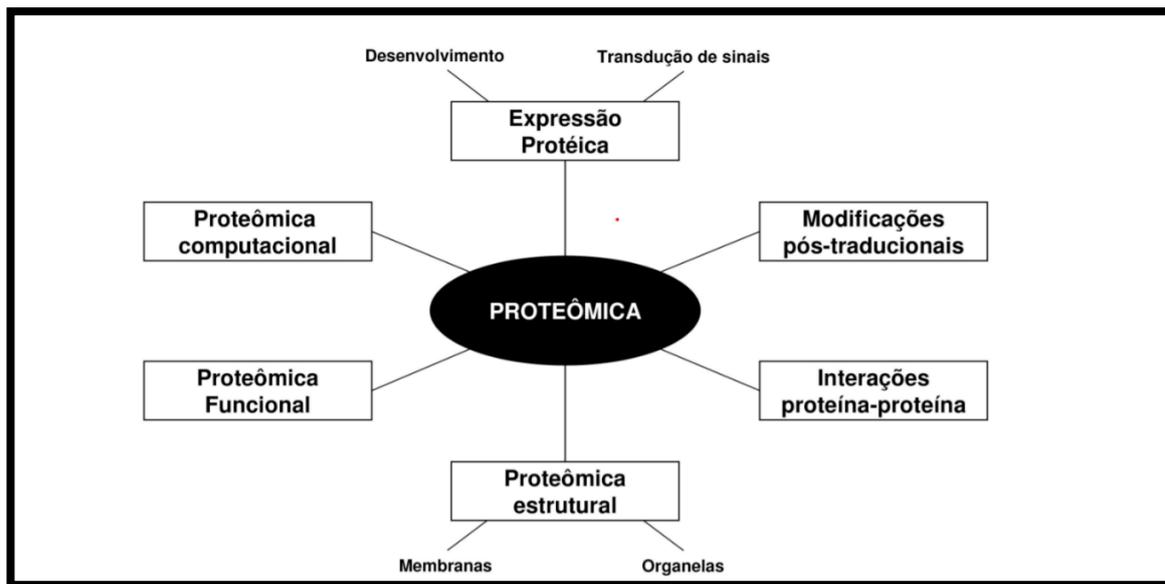


**Figura 1-** Resposta da Planta aos fatores de stress abiótico. (Adaptado Ornamentais & Nativas, 2008).

## 1.6. Importância da proteômica na luta contra os efeitos dos impactes climáticos

O proteoma caracteriza o conjunto de proteínas e variantes de proteínas que podem ser expressas por um genoma, célula, tecido ou organismo, num determinado momento (Pandey & Mann, 2000). A proteômica estuda as proteínas e as suas interações celulares (Aslam, Basit, Nisar, Khurshid, & Rasool, 2017; Cho, 2007). Mark Wilkins, utiliza pela primeira vez o termo proteômica como “o conteúdo proteico de um genoma” (Wilkins et al., 1996). Atualmente, e pela expansão das técnicas moleculares, a sequência de nucleótidos obtidos a partir de um genoma pode ser rapidamente convertida a proteínas (Hakeem, Tombuloğlu, & Tombuloğlu, 2016). Assim, as proteínas codificadas pelos genes e o controle da sua expressão podem ser rapidamente identificados (Lockhart & Winzeler, 2000).

O aumento da informação molecular disponível e o desenvolvimento em paralelo de técnicas de bioinformática e instrumentação analítica permitem que a proteômica seja considerada uma das ferramentas essenciais para identificar respostas relativas ao stress biótico e abiótico (Ahmad et al., 2016; Vinocur & Altman, 2005). A proteômica passou de uma simples identificação de proteínas para uma análise detalhada de perfis quantitativos, modificações pós-traducionais dinâmicas (PTMs), localização subcelular, complexos proteicos, vias de sinalização, e interação entre proteínas entre outros (Agrawal et al., 2013; Agrawal et al., 2011; Hossain, Nouri, & Komatsu, 2012; Matros, Kaspar, Witzel, & Mock, 2011) (Figura 2).



**Figura 2** - Tipos e aplicações de estudos em proteômica em diferentes sistemas biológicos. (Adaptado de Vinocur & Altman, 2005).

Estudos recentes em proteômica quantitativa derivada de instrumentos de alta resolução e precisão de massa têm vindo a contribuir com informações de extrema importância para a compreensão do crescimento das plantas, o seu desenvolvimento e a sua interação com o meio ambiente. Com estes avanços, torna-se assim possível não só aumentar/melhorar o valor nutricional e o rendimento das culturas, mas também compreender como os mecanismos de adaptação das culturas aos fatores de stress abióticos e bióticos (Hu, Rampitsch, & Bykova, 2015). Atualmente são também estudadas as respostas celulares em diversos órgãos da planta, quando submetidos a diferentes fatores de stress abiótico, de modo a perceber como neles variam essas respostas. A proteômica de órgãos da planta ajuda em grande parte a perceber de forma mais detalhada os mecanismos que regulam as respostas ao stress e a transdução de sinais nos vários organelos (Hossain et al., 2012; Komatsu & Hossain, 2013).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Esta dissertação tem como objetivo geral avaliar o impacto do aumento da temperatura no proteoma de *Coffea canephora* e *Coffea arabica*, bem como quantificar e detetar as proteínas e as vias regulatórias envolvidas na resposta ao stress térmico.

### 2.2. Objetivos específicos

Esta dissertação pretende responder aos seguintes objetivos específicos:

1. Determinar o impacto do aumento da temperatura nas duas espécies mais comercializadas de café;
2. Verificar o efeito moderado e extremo da temperatura (37°C e 42°C);
3. Determinar a existência de uma resposta diferencial entre *C. canephora* e *C. arabica* ao aumento moderado e extremo da temperatura;
4. Identificar potenciais mecanismos de resiliência que possam ser utilizados no melhoramento do café ao stress térmico.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Plantas em estudo e condições de crescimento**

Neste estudo foram incluídas plantas dos dois genótipos de café: *C. canephora* ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* L. ev. Icatu Vermelho (Icatu), uma variedade resultante do cruzamento de *C. canephora* e *C. arabica* ev. Mundo Novo. As plantas foram previamente cultivadas por sete anos em vasos de 80 litros em câmaras de crescimento *walk in* (EHHF 10000, ARALAB, Portugal) em condições de temperatura controladas (25/20°C, dia/noite), radiância (ca. 700-800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), humidade relativa (70%), fotoperíodo (12h) e 380  $\mu\text{L CO}_2 \text{L}^{-1}$  de ar. Durante esse tempo, as plantas foram mantidas sem restrições de água, nutrientes, ou constrições de desenvolvimento radicular.

#### **3.2. Implementação de Stress Térmico**

O stress térmico implementado para esta dissertação foi imposto sobre as plantas de maneira gradual, de modo a causar a aclimação das mesmas. O aumento de temperatura de 25/20°C para 42/30°C foi imposto a um ritmo de 0.5°C por dia<sup>-1</sup>, com uma estabilização de 5 dias desde o controlo a 25°C, passando por um aumento moderado de temperatura (37°C) e um aumento extremo de temperatura (42°C). Após isso, as temperaturas foram reajustadas para os 25°C e as plantas sujeitas aos diferentes tratamentos térmicos foram totalmente regadas e monitorizadas por um período adicional de 14 dias (Rec14). A totalidade da experiência durou 82 dias. Por cada tratamento (25°C, 37°C, 42°C e Rec14) foram recolhidas 6-8 folhas por cada planta, utilizando 3 réplicas biológicas por tratamento. As folhas foram rapidamente congeladas em nitrogénio líquido e armazenadas a -80°C, até serem utilizadas para análise.

#### **3.3. Extração de Proteínas**

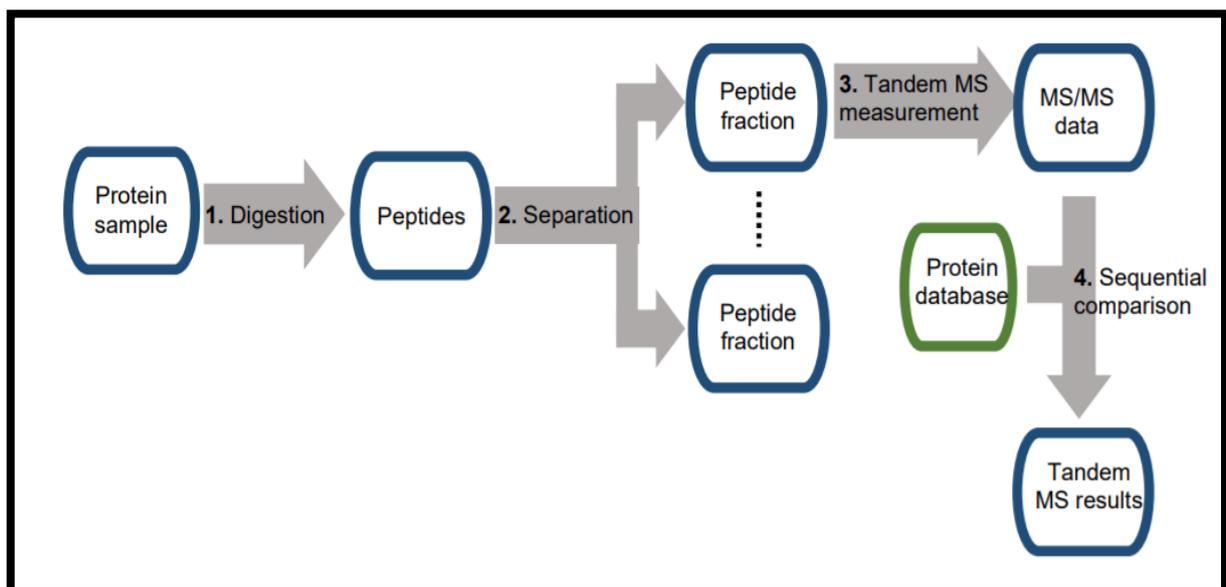
As proteínas foram extraídas seguindo os métodos indicados em (Dubberstein et al., 2020). A concentração proteica foi determinada pelo método de *Coomassie blue dye-binding* utilizando a BSA (*Bovine Serum Albumine*) como padrão. As amostras proteicas foram

novamente suspensas em 30  $\mu\text{L}$  de uma amostra tampão LDS (*Invitrogen*), e incubadas por 5 minutos a 99°C, seguidas de armazenamento a -20°C até a sua sequenciação.

### 3.4. Espectrometria de massa de alta resolução

Os péptidos foram obtidos através do uso de uma nanocoluna (*Acclaim PepMap100 C18*, com 3  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 75  $\mu\text{m}$  id x 50 cm) com um gradiente de 90 minutos desenvolvido a um coeficiente de 0.2  $\mu\text{L min}^{-1}$  de 4% para 25% do tampão B (80%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0.1%  $\text{HCOOH}$ ) durante 65 minutos, seguido de 25% para 40% por 15 minutos. O sistema *Ultimate 3000 LC* foi diretamente acoplado ao espectrômetro de massa (*Q-Exactive HF, ThermoFisher*) através de uma fonte de eletropulverização.

Foi obtida através de uma variação de  $m/z$  (massa dividida pela carga elétrica) de 350 para 1800 com uma resolução de 60 000, uma pesquisa completa de espectros de massa. Os 20 íões percursos mais abundantes em cada ciclo de pesquisa foram sequencialmente sujeitos a uma fragmentação. A pesquisa espectrométrica de massa iniciou-se assim que foi atingida a marca de 105 íões a uma intensidade limite de 17000 e estados de carga potencial de 2<sup>+</sup> e 3<sup>+</sup>, após ser efetuada a seleção de íões com uma exclusão dinâmica com duração de 10 segundos. A resolução do instrumento utilizado na pesquisa por espectrometria de massa foi fixada no valor de 15 000 (Figura 3)

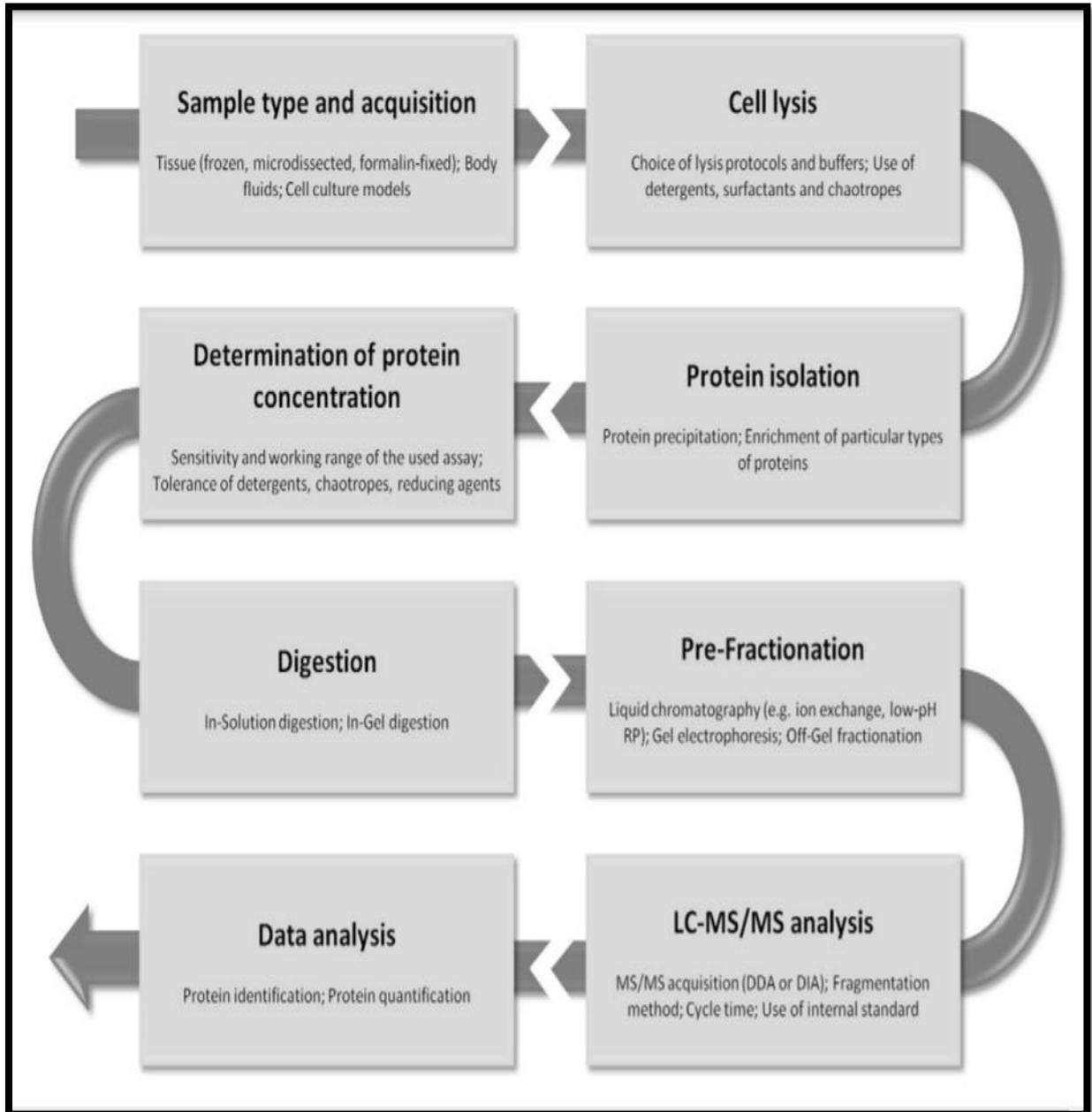


**Figura 3-** Etapas de identificação de proteínas através do processo de espectrometria *tandem* (Adaptado Sequeira et al, 2017).

### 3.5. Identificação de proteínas e quantificação *label free*

Os arquivos *raw data* referentes à espectrometria de massa foram analisados utilizando o programa *Mascot DAEMON* versão 2.3.2. Foi usada a base de dados de sequências proteicas de *C. canephora* (retirada do NCBI), de modo a realizar o emparelhamento péptido para espectro para ambos os genótipos. Foram utilizados os seguintes parâmetros de pesquisa: Tripsina como enzima, máximo de duas clivagens perdidas, uma tolerância de massa de 5 ppm no ião precursor, uma espectrometria de massa com 0.02 Da, modificação fixa de cisteína carboxiamidometilada, metionina oxidada e desamidação ND como modificações variáveis. Todas as correspondências peptídicas obtidas com *MASCOT*, com valores inferiores ao *p-value* de 0.05 foram filtrados e assignados a uma proteína, seguindo os princípios da parcimônia. Foram apenas contabilizadas proteínas que apresentassem pelo menos dois péptidos. Desta forma a taxa de falsa descoberta (FDR) obtida e avaliada através de uma pesquisa inversa na base de dados, foi de menos de 1% ao nível da identificação proteica. Dado que as análises preliminares determinaram que uma das replicas de *C. arabica* era um *outlier*, a mesma foi retirada das subseqüentes análises (Figura 4).

As correspondências péptido-espectro (PSMs) foram contabilizadas para cada proteína de modo a obter uma quantificação *label free* (contagem de espectros) (Figura 4). Para cada proteína, o fator de abundância espectral normalizado (NSAF) foi calculado, através do somatório das suas contagens de espectros observados em todas as amostras, dividindo estes pelos valores das suas massas moleculares em kDa. Estes valores de NSAF foram apresentados sobre a forma de percentagem (%NSAF), dividindo o NSAF de cada proteína pelo somatório de todos os valores de NSAF detetados na totalidade do conjunto de dados. Por uma questão de comparação utilizou-se *C. canephora* como referência. As anotações das proteínas através dos termos presentes na ontologia génica (GO), foram obtidas utilizando uma pesquisa DIAMOND, sobre a base de dados Uniprot (Bateman et al., 2021). Os homólogos foram descobertos nesta pesquisa quando mapeados para termos GO provenientes do *Coffe Genome Hub* (<http://coffee-genome.org/download>).



**Figura 4-** Fluxograma generalizado de uma análise de quantificação proteômica “label free” (Adaptado Megger et al., 2013).

### 3.6. Identificação de proteínas diferencialmente diferentes à temperatura

As quantidades de proteínas presentes nas diferentes condições de temperatura em cada genótipo foram comparadas através do recurso a múltiplos testes  $t$  ( $t$ -tests), tendo em consideração amostras com variâncias desiguais e repartições bilaterais de quantias diferenciadas de proteínas. Proteínas com um  $p$ -value no teste  $t$  inferior a 0.05 e uma mudança de observação para observação (*fold-change*) superior a 1.5 foram identificadas como sendo proteínas diferencialmente abundantes (DAPs). Foi realizada uma análise quantitativa e qualitativa das proteínas mais abundantes (UP) e menos abundantes (DWN) no proteoma, de ambas as variedades, após serem submetidas aos tratamentos térmicos, face à temperatura controlo. As comparações feitas foram, portanto, entre três tratamentos térmicos e a temperatura controlo, sendo utilizada a seguinte nomenclatura para representar cada comparação:

- UP 37 vs. 25 – comparação da abundância de proteínas no tratamento térmico moderado a 37°C com o controlo a 25°C;
- UP 42 vs. 25 - comparação da abundância de proteínas no tratamento térmico extremo a 42°C com o controlo a 25°C;
- UP Rec\_25 vs. 25 - comparação da abundância de proteínas no tratamento térmico de recuperação com o controlo a 25°C.
- DWN 37 vs. 25 - comparação da repressão de proteínas no tratamento térmico a 37°C com o controlo a 25°C;
- DWN 42 vs. 25 - comparação da repressão de proteínas no tratamento térmico a 42°C com o controlo a 25°C;
- DWN Rec\_25 vs. 25 - comparação da repressão de proteínas no tratamento térmico de recuperação com o controlo a 25°C.

**Declaração de disponibilidade de dados:** Os dados de espectrometria foram disponibilizados para consulta pública no ProteomeXchange Consortium via repositório do parceiro PRIDE, com os identificadores de conjunto de dados PXD019474, PXD019541, PXD019830 e PXD019831

## 4. Resultados

### 4.1. Principais características do proteoma de *Coffea canephora* e *Coffea arabica*

A análise proteômica quantitativa dos dois genótipos de café permitiu a obtenção de 377 285 proteínas totais expressas no total de todas as temperaturas às quais foram submetidas as plantas. Foram contabilizadas um total de 179 013 proteínas para as 12 amostras em estudo para a espécie *Coffea canephora* (Quadro 1) e 198 272 proteínas para a espécie *Coffea arabica* (Quadro 2).

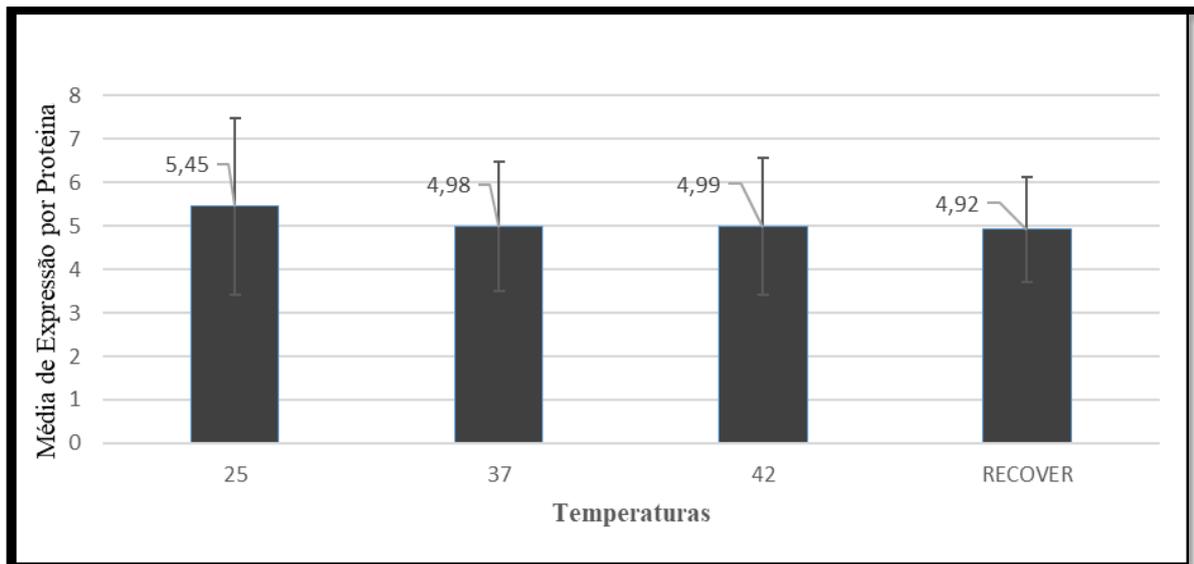
**Quadro 1.** Quantificação de proteínas expressas para a espécie *Coffea canephora*.

<b>C. canephora</b>				
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Número Total de Proteínas Expressas</b>			<b>Total</b>
<b>25</b>	13753	17101	17106	<b>47961</b>
<b>37</b>	15170	14263	14402	<b>43834</b>
<b>42</b>	14788	15416	13699	<b>43903</b>
<b>RECOVER</b>	14345	14428	14542	<b>43315</b>
<b>TOTAL</b>				<b>179013</b>

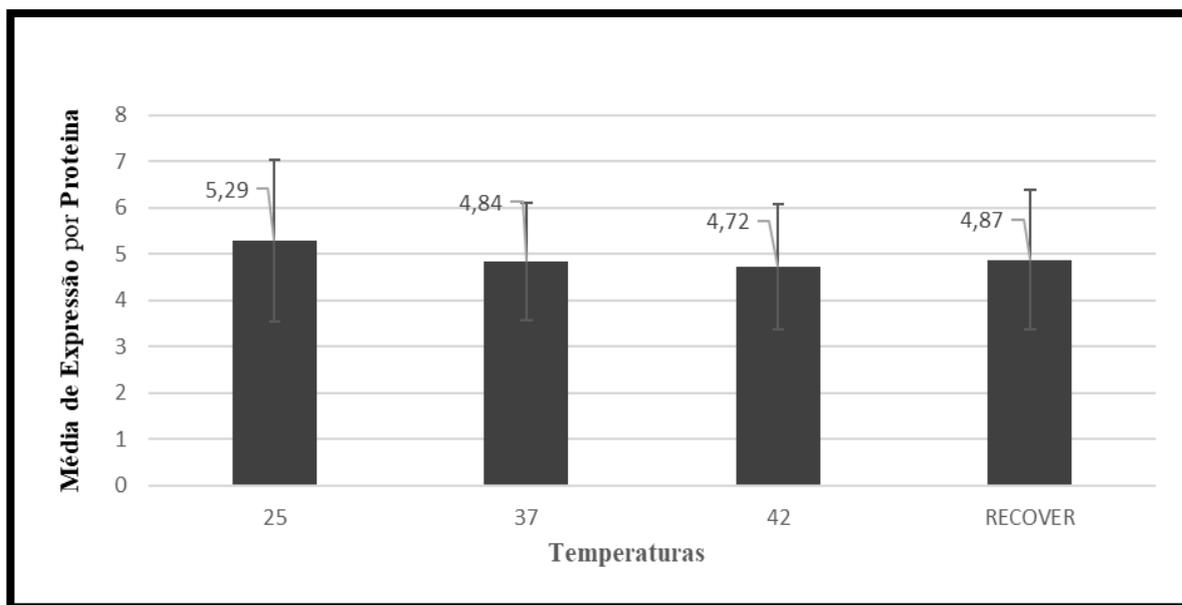
**Quadro 2.** Quantificação de proteínas expressas para a espécie *Coffea arabica*.

<b>C. arabica</b>				
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Número Total de Proteínas Expressas</b>			<b>Total</b>
<b>25</b>	16728	40210	14307	<b>71245</b>
<b>37</b>	15014	13943	13638	<b>42595</b>
<b>42</b>	14247	13817	13510	<b>41573</b>
<b>RECOVER</b>	14666	14462	13732	<b>42859</b>
<b>TOTAL</b>				<b>198272</b>

Juntando todos os tratamentos de calor, foram identificadas 2933 sequências de polipéptidos comuns a ambos os genótipos das espécies. Foi contabilizado o valor médio expresso por cada uma dessas proteínas de modo a melhor visualizar o efeito da temperatura (Figura 5 e Figura 6), verificando uma similitude entre variedades, nos valores apresentados. No entanto, verifica-se que, em ambas espécies, o maior teor do valor médio de proteínas expressas foi observado a 25°C.



**Figura 5-** Valores médios da expressão proteica de cada em *Coffea canephora*.



**Figura 6-** Valores médios da expressão proteica de cada proteína em *Coffea arabica*.

A quantificação das proteínas mais abundantes (Top 20%) estabelecidas através do seu %NSAF resultaram na identificação de 22 proteínas, expressas em ambos os genótipos (Quadro 3). Este resultado indica um perfil proteico com uma grande similaridade entre as duas variedades em estudo. A proteína *auxin binding protein ABP20* foi registada como a mais

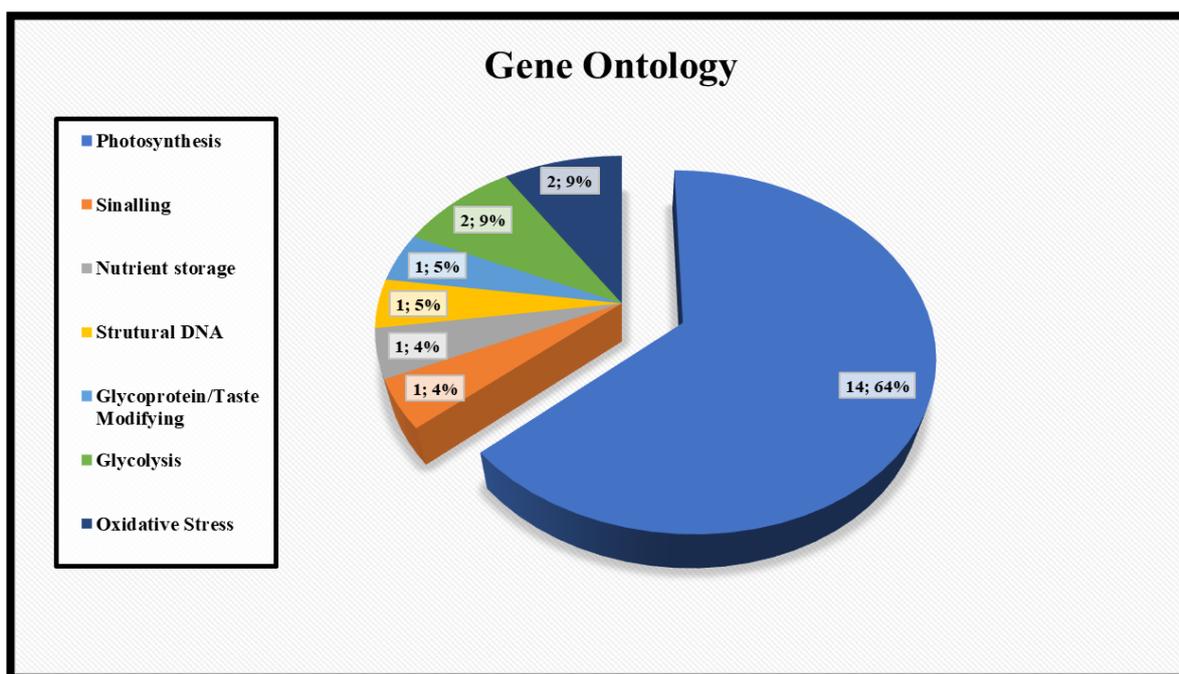
abundante em ambos os genótipos, sendo a segunda mais abundante a proteína “Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic”.

No quadro 3 verificamos a presença de três proteínas que apresentam variações significativas nos valores de %NSAF entre genótipos: *Putative Bark Storage Protein A*, que apresenta uma diferença 80% no seu peso de %NSAF; *Putative Miraculin*, que apresenta uma variação de 18.5% no seu peso de %NSAF e por fim a proteína *Peroxidase 76*, com uma diferença no peso de %NSAF de aproximadamente 71% (a diferença é verificada sempre da variedade *C. canephora* em relação à variedade *C. arabica*).

**Quadro 3.** Lista das proteínas mais abundantes em *C. canephora* comparativamente a *C. arabica* (definidas por contribuírem para 20% do NSAF cumulativo para ambas as variedades) e respectivas categorizações ontológicas gerais. As proteínas que variam significativamente entre genótipos (t test.  $P > 0.05$ ) estão indicadas a negrito.

Protein annotation	<i>C. canephora</i> NSAF %	<i>C. arabica</i> NSAF %	General Category
Auxin-binding protein ABP20	2,850	2,308	Signaling
Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	1,597	1,58	photosynthesis
<b>Putative Bark storage protein A*</b>	<b>1,544</b>	<b>0,297</b>	Nutrient storage
Photosystem I reaction center subunit II, chloroplastic	1,309	1,274	photosynthesis
Histone H4	1,084	0,942	Structural DNA
Ribulose biphosphate carboxylase small chain SSU11A, chloroplastic	1,014	1,062	photosynthesis
Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	0,969	0,954	photosynthesis
<b>Putative Miraculin*</b>	<b>0,921</b>	<b>0,171</b>	Glycoprotein/Taste Modifying
Plastocyanin, chloroplastic	0,882	0,372	photosynthesis
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	0,818	0,608	Glycolysis
Photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplastic	0,801	0,550	photosynthesis
Phosphoglycerate kinase, cytosolic	0,760	0,574	Glycolysis
Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase	0,747	0,615	Oxidative Stress
Photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic	0,656	0,630	photosynthesis
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic	0,654	0,656	photosynthesis
Carbonic anhydrase, chloroplastic	0,630	0,412	photosynthesis
Chlorophyll a-b binding protein CP29.2, chloroplastic	0,578	0,519	photosynthesis
<b>Peroxidase 73</b>	<b>0,544</b>	<b>0,157</b>	Oxidative Stress
RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic	0,540	0,475	photosynthesis
Quinone oxidoreductase-like protein At1g23740, chloroplastic	0,509	0,455	photosynthesis
Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplastic	0,500	0,686	photosynthesis
20 kDa chaperonin, chloroplastic	0,470	0,348	photosynthesis

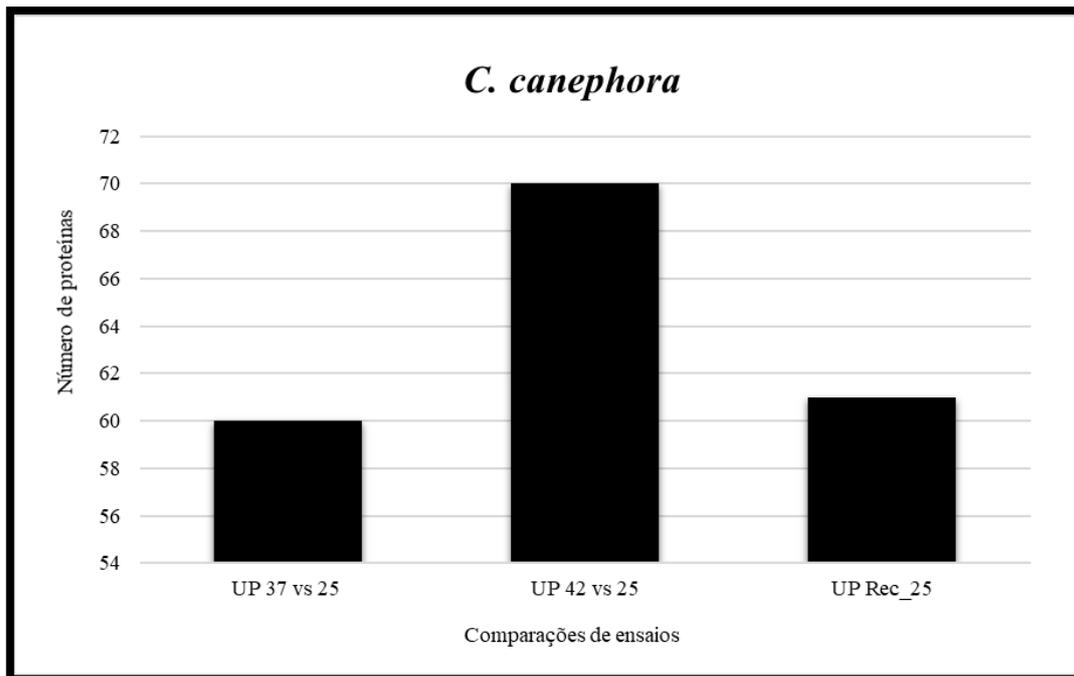
Nas 22 proteínas pertencentes ao %NSAF da variedade *C.canephora*, foi verificado que 14 delas estão associadas diretamente com o processo “Fotossíntese”, o que representa uma maioria absoluta de 64% das proteínas em análise (Figura 7). A proteína mais representativa foi a *Oxigen-evolving enhancer protein 1*, que apresenta um elevado peso proteico, totalizando 1,597% e 1,58% do %NSAF para as variedades *C. canephora* e *C. arabica* respectivamente. Todas as outras categorias apresentam pouca abundância quando comparadas com a categoria “Fotossíntese” (Figura 7).



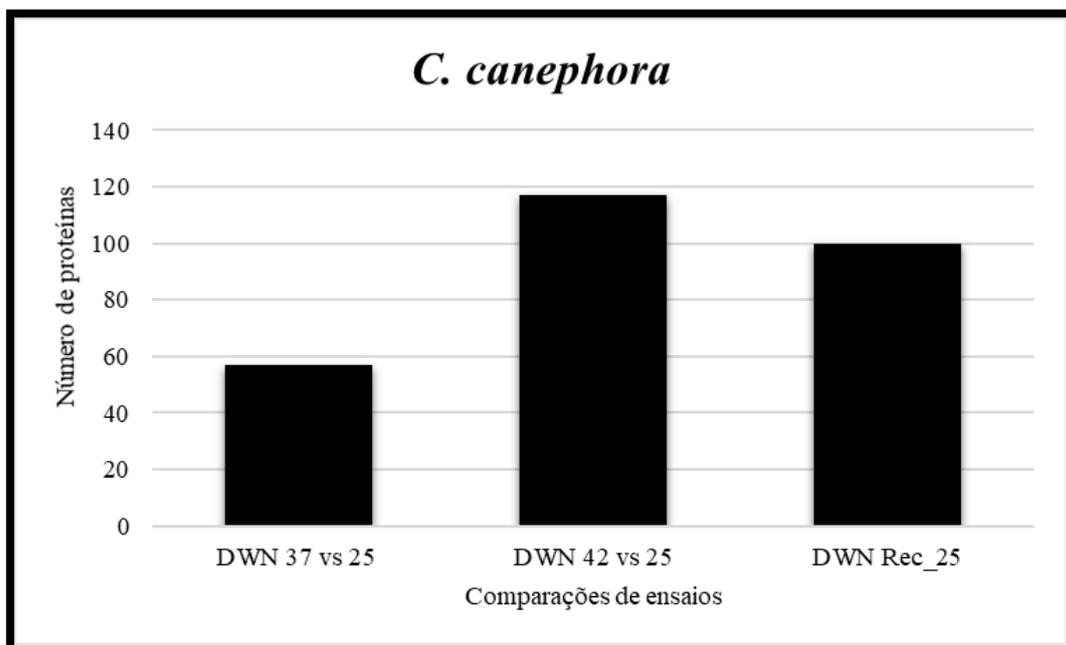
**Figura 7-** Categorização ontológica das proteínas mais representativas nos genomas das duas variedades.

#### 4.2. Análise da abundância de proteínas diferenciais presentes em cada tratamento para *Coffea canephora* e *Coffea arabica*.

Após analisar os dados referentes às proteínas diferenciais para *C. canephora* verificou-se uma maior abundância de proteínas expressas na temperatura superior de 42°C, com um total de 70 proteínas mais abundantes em comparação com o controlo (Figura 8). Tal representa um crésimo de cerca de 14% em relação aos outros dois ensaios de temperatura para esta variedade.



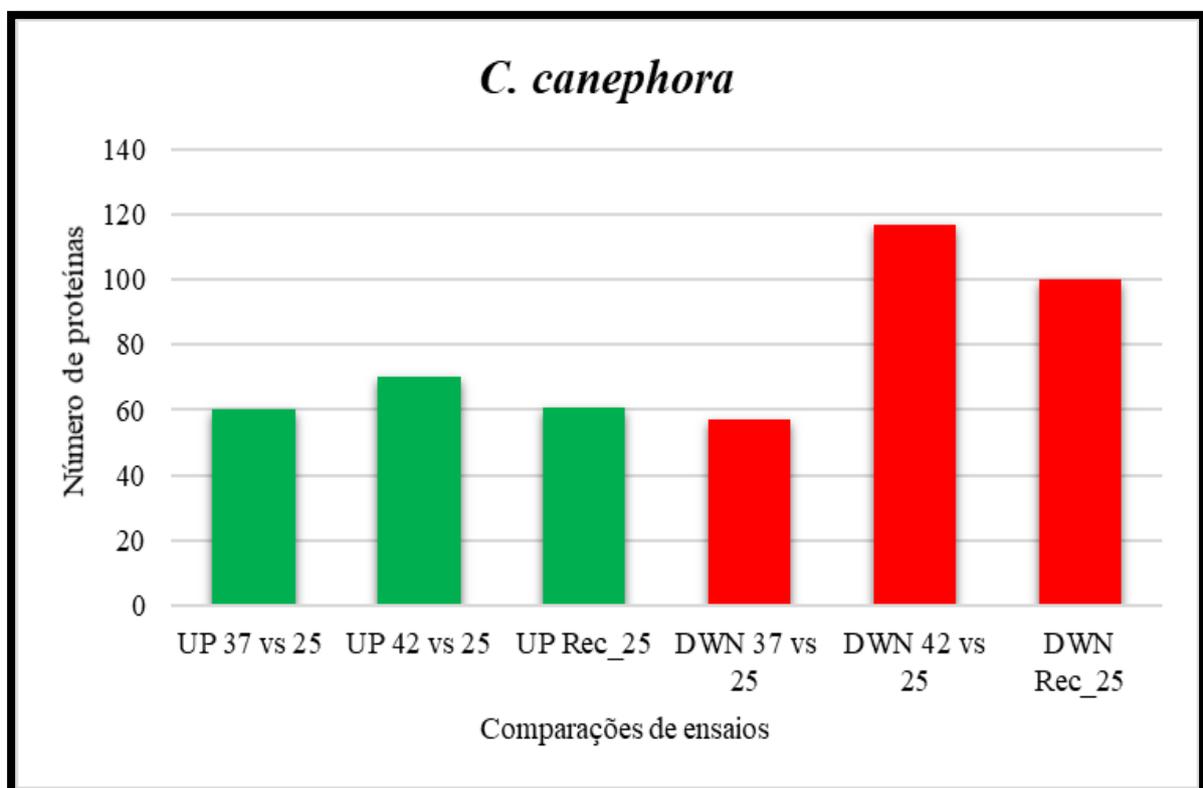
**Figura 8-** Análise comparativa do número de proteínas mais abundantes com o aumento de temperatura face à temperatura controlo em *C. canephora*.



**Figura 9-** Análise comparativa do número de proteínas menos abundantes com o aumento de temperatura face à temperatura controlo em *C. canephora*.

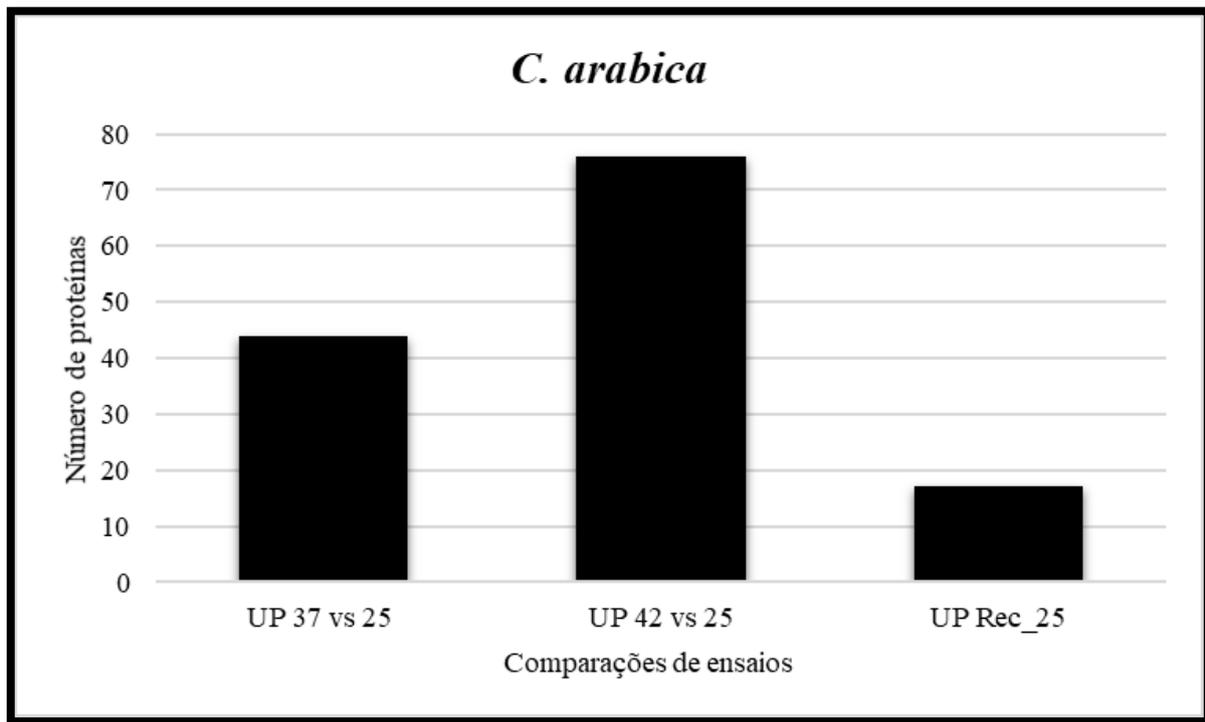
O mesmo padrão foi obtido na quantificação das proteínas menos abundantes, onde o maior número de proteínas diferenciais (117 proteínas) face ao controlo foi registado também a 42°C (Figura 9). Tal representa uma variação de 14% em relação ao ensaio “DWN Rec\_25” e uma variação de 51% para o ensaio com o tratamento térmico inferior, o “DWN 37 vs 25”

Comparando a abundância e a repressão das proteínas é possível verificar que na variedade *C. canephora* foram contabilizadas mais proteínas reprimidas que abundantes em relação ao controlo a 25°C, sendo essa repressão maior a 42°C (Figura 10).

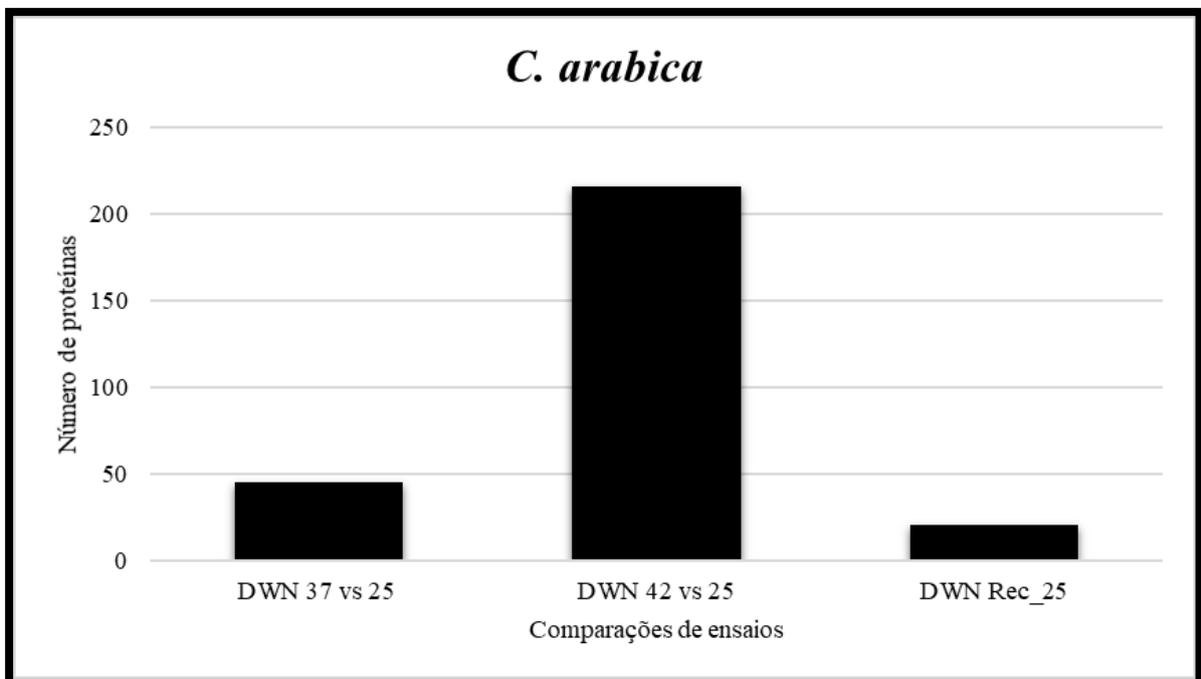


**Figura 10-** Análise comparativa referente ao número de proteínas menos e mais abundantemente expressas face ao controlo, em *C. canephora*.

Relativamente à variedade *C. arabica* registou-se o mesmo padrão referido anteriormente, havendo uma maior abundância de proteínas a 42°C (Figura 11). Tal representa um acréscimo de 42% em relação à temperatura de 37°C, e um acréscimo de 78% em relação às plantas em recuperação após o tratamento com calor.



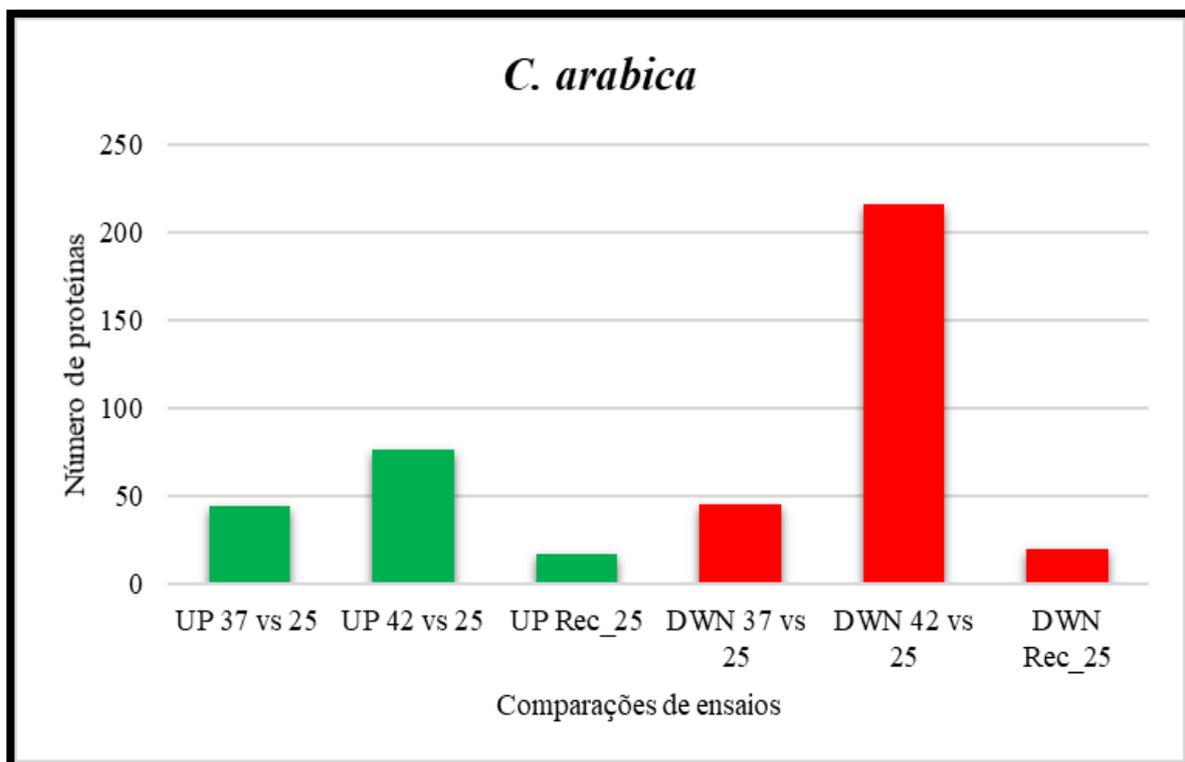
**Figura 11-** Análise comparativa do número de proteínas mais abundantes com o aumento de temperatura face à temperatura controlo em *C. arabica*.



**Figura 12-** Análise comparativa do número de proteínas menos abundantes com o aumento de temperatura face à temperatura controlo em *C. arabica*.

O mesmo foi registado nas proteínas menos abundante, onde 216 proteínas foram reprimidas a 42°C (Figura 12). Este ensaio obteve as maiores variações proteicas entre os distintos tratamentos de exposição térmica: 80% entre o ensaio “DWN 45 vs 25” e o ensaio “DWN 37 vs 25”. A maior variação em todo o estudo foi registada entre 42°C e o período de recuperação, com uma percentagem de variação proteica de cerca de 91%.

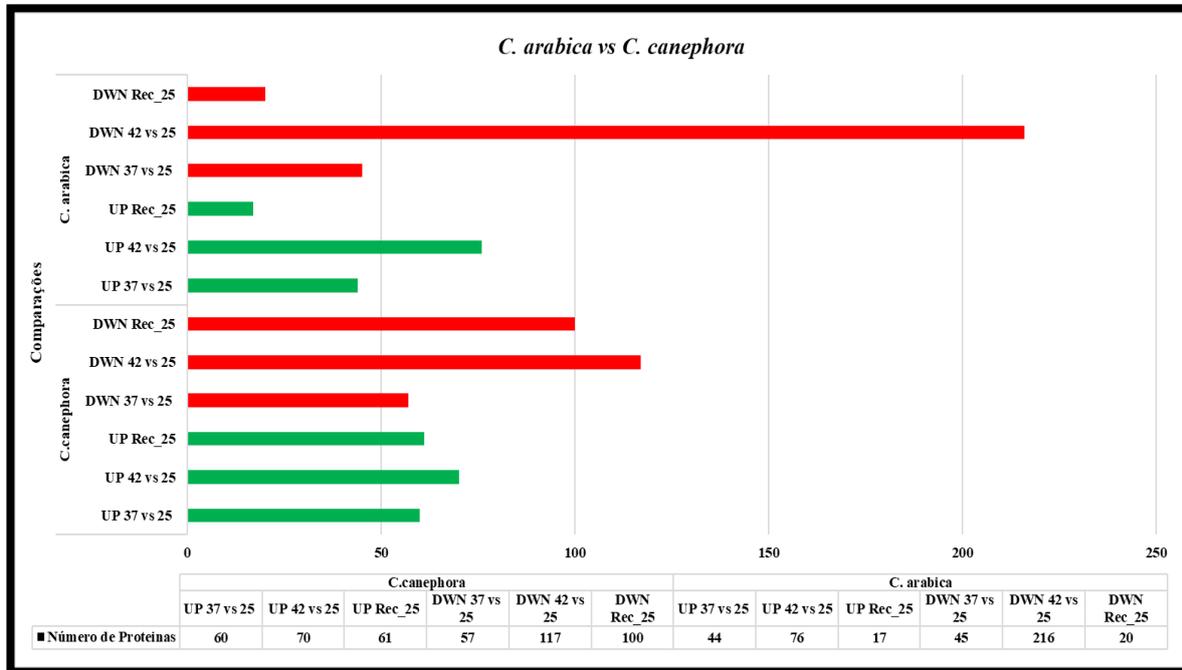
Comparando a abundância e a repressão das proteínas é possível verificar os efeitos drásticos da temperatura extrema 42°C onde foi observada a maior repressão de proteínas em *C. arabica* (Figura 13).



**Figura 13-** Análise comparativa referente ao número de proteínas menos e mais abundantemente expressas face ao controlo, em *C. arabica*.

A comparação das duas variedades em estudo registou 465 proteínas diferenciais em *C. canephora* e 418 proteínas diferenciais em *C. arabica* (Figura 14). A variedade *C. arabica* registou o maior número de proteínas diferenciais, 48% das quais no ensaio 42°C (216 proteínas).

No tratamento térmico de 42°C, o número de proteínas (Up e Dwn) foi sempre superior na variedade arábica.

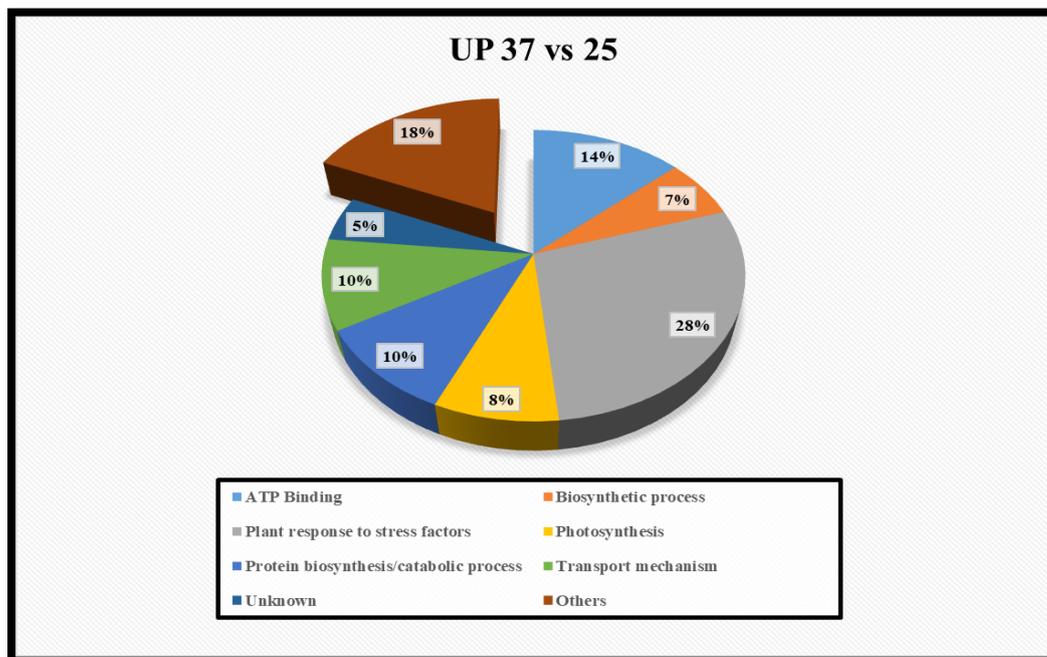


**Figura 14-** Síntese comparativa da menor e maior abundância de proteínas em *C. canephora* e *C. arabica* após os distintos tratamentos de calor.

### 4.3. Ontologia das proteínas diferenciais

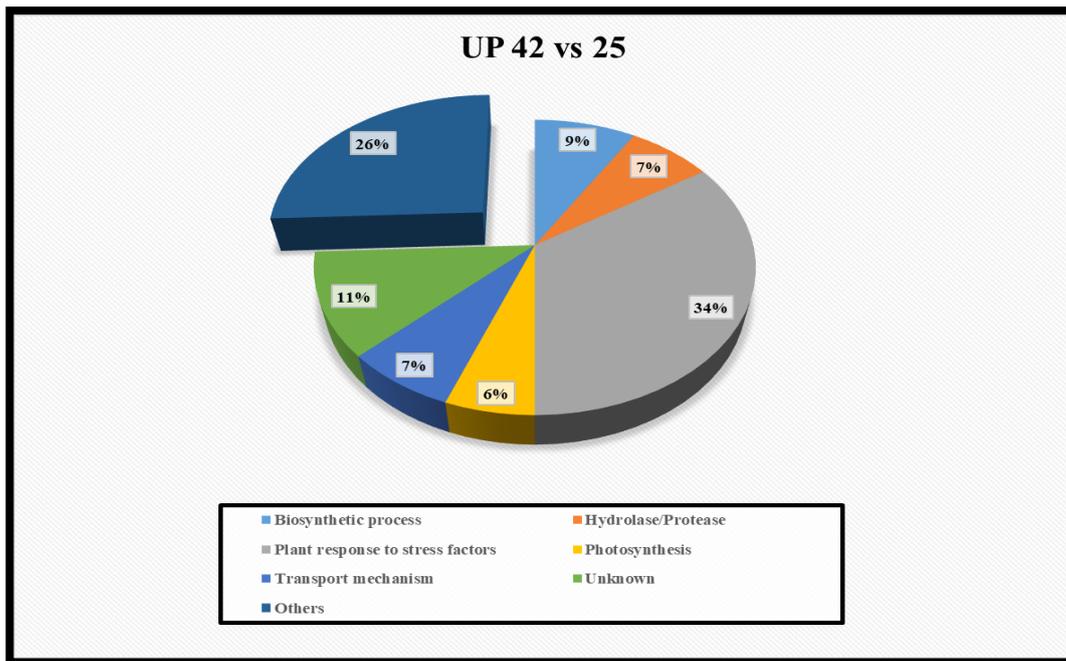
#### 4.3.1 Ontologia das proteínas diferenciais mais abundantes em *C.canephora*

A ontogenia das 60 proteínas registradas como as mais abundantes no proteoma das plantas submetidas ao tratamento térmico a 37°C (Figura 15) revelou que 17, ou seja 28% estavam diretamente relacionadas com respostas das plantas a fatores de stress (calor, frio, luz, falta de água, entre outros) (Figura 15). Como “Fotossíntese” foram contabilizadas seis proteínas (8% da totalidade de proteínas). As restantes pertenciam a distintas categorias e pela sua pequena abundância foram agrupadas na categoria “Outros”, tendo esta uma representatividade de 18%. Foram ainda registradas três proteínas sem anotação conhecida (Figura 15).



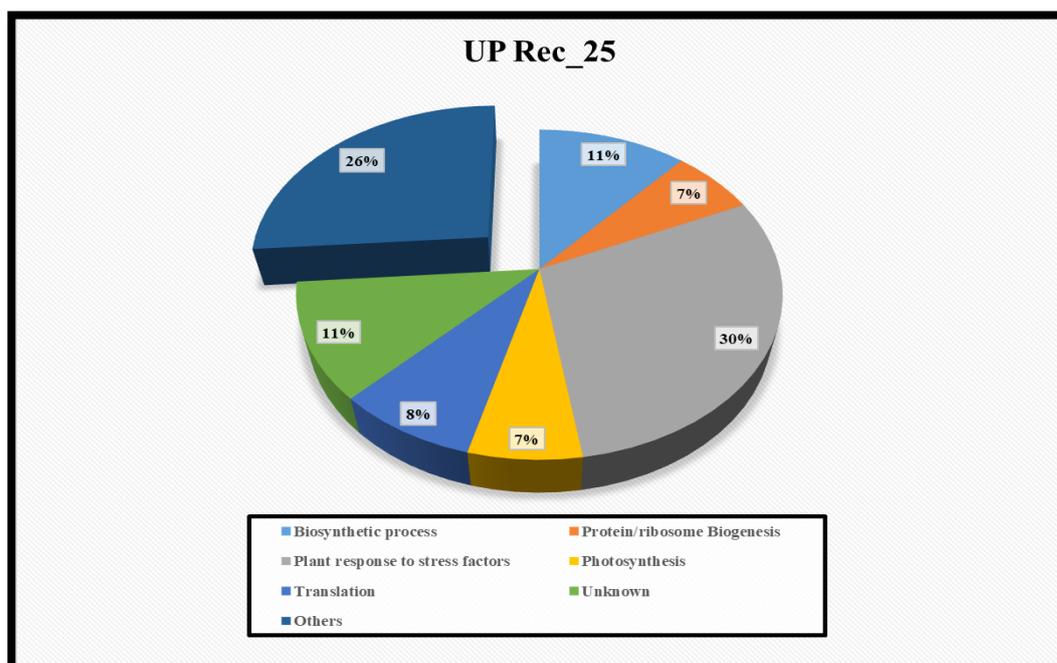
**Figura 15-** Categorização ontológica das proteínas mais abundantes em *C. canephora* a 37°C em comparação com o controle a 25°C.

A ontogenia das 70 proteínas registradas como as mais abundantes no proteoma das plantas submetidas ao tratamento térmico a 42°C revelou que 34%, ou seja, 24 proteínas estavam diretamente associadas a respostas ao stress como foi verificado no tratamento analisado anteriormente (Figura 16). Foi verificada uma menor abundância de proteínas associadas com a fotossíntese (apenas quatro), comparativamente com o tratamento anterior. No caso deste tratamento foram verificadas diversas proteínas sem anotação ontológica, perfazendo um total de oito proteínas (11% das proteínas).



**Figura 16-** Categorização ontológica das proteínas mais abundantes em *C. canephora* a 42°C em comparação com o controlo a 25°C.

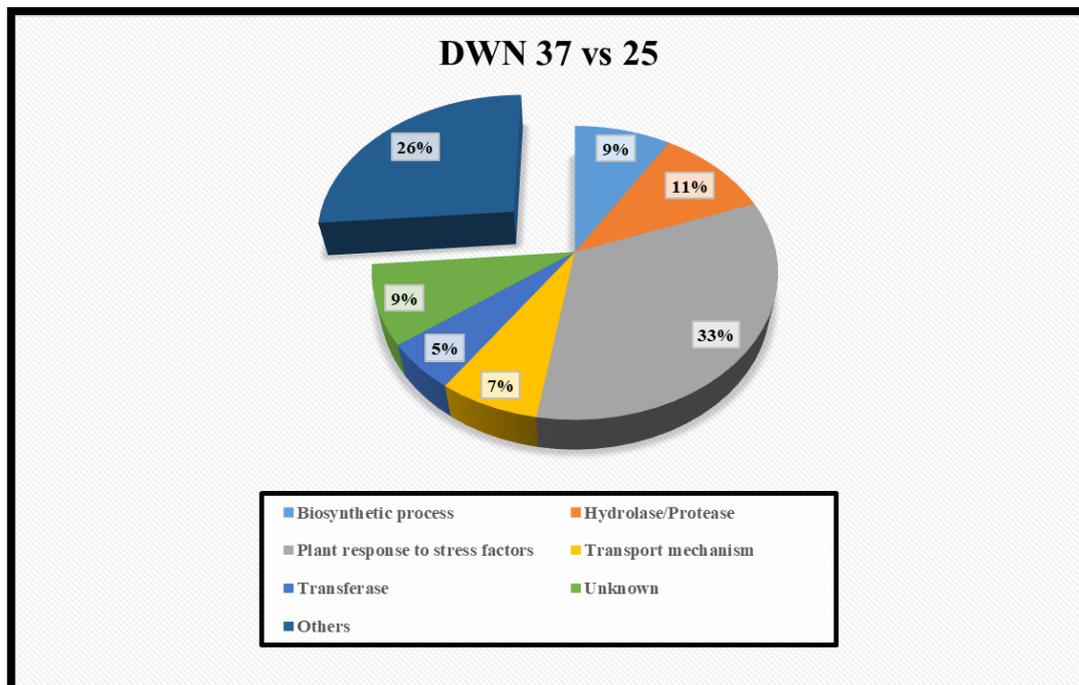
Nas plantas em recuperação foram contabilizadas 61 proteínas diferenciais, sendo este número muito semelhante ao verificado a 37°C (61 proteínas e 60 na comparação referida). Novamente a categoria com maior relevância foi a resposta a fatores de stress com 18 proteínas (34%), e um mesmo valor percentual verificado na comparação anterior (Figura 17).



**Figura 17-** Categorização ontológica das proteínas mais abundantes em *C. canephora* no período de recuperação em comparação com o controlo a 25°C.

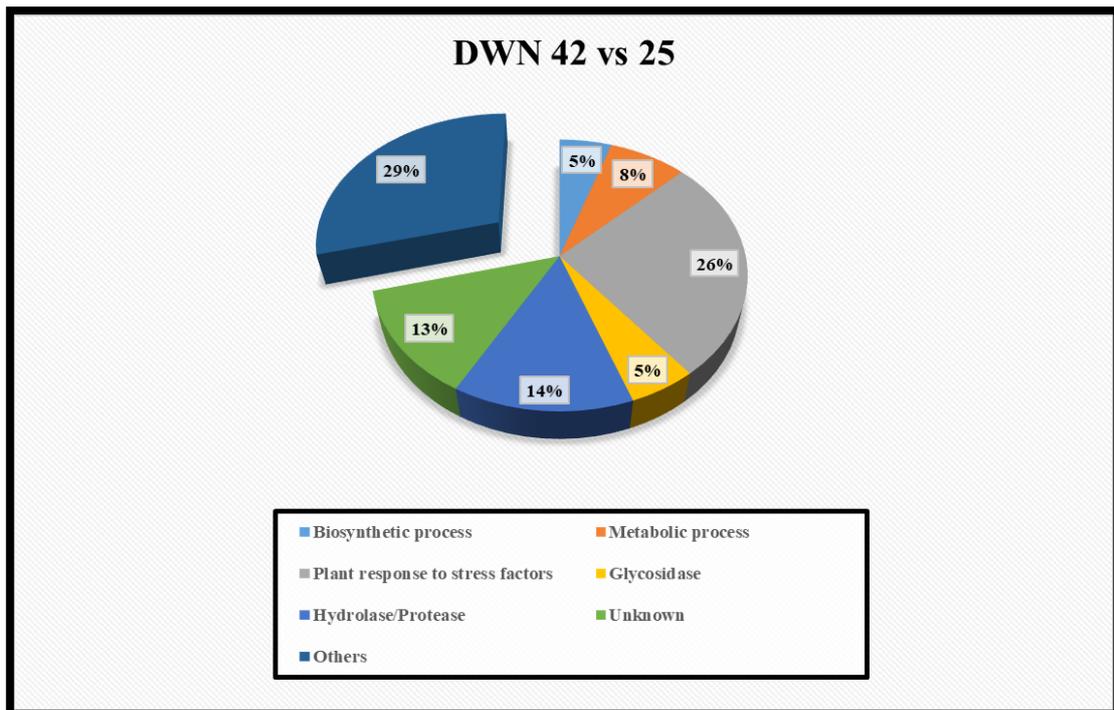
#### 4.3.2 Ontologia das proteínas diferenciais menos abundantes em *C. canephora*

Foram contabilizadas 57 proteínas como sendo menos abundantes a 37°C face ao controlo e envolvidas nas seguintes funções: resposta a fatores de Stress, com 19 proteínas (33%), seguida de proteínas com funções quer de hidrólase, quer de protéase, com 6 proteínas (11%) e proteínas responsáveis por processos biossintéticos, contabilizando 5 proteínas (9%) (Figura 18). Registou-se também a presença 5 proteínas (9%) sem anotação (Figura 18).



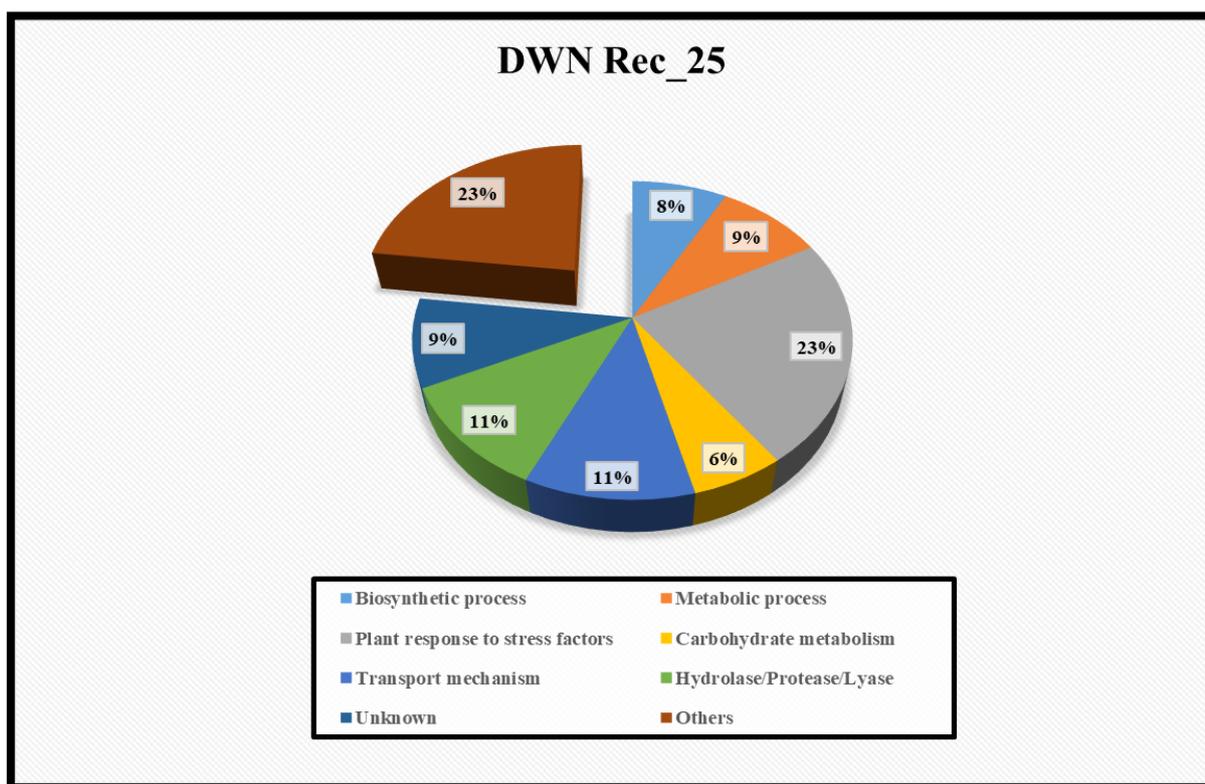
**Figura 18-** Categorização ontológica das proteínas menos abundantes em *C. canephora* a 37°C em comparação com o controlo a 25°C.

Foram contabilizadas 117 proteínas como sendo menos abundantes no proteoma das plantas submetidas ao tratamento térmico a 42°C, comparando com o controlo a 25°C (Figura 19). A categoria com maior representatividade controla a resposta das plantas aos fatores de stress com 31 proteínas (33%), seguida da Hidrólise/Protéase com 16 proteínas (14%) e por fim, proteínas pertencentes a processos metabólicos diversos com uma relevância de 8% (9 proteínas pertencentes a este grupo). Várias proteínas não foram identificáveis em termos de função ontológica: 15 proteínas (13%) (Figura 19).



**Figura 19-** Categorização ontológica das proteínas menos abundantes em *C. canephora* a 42°C em comparação com o controlo a 25°C.

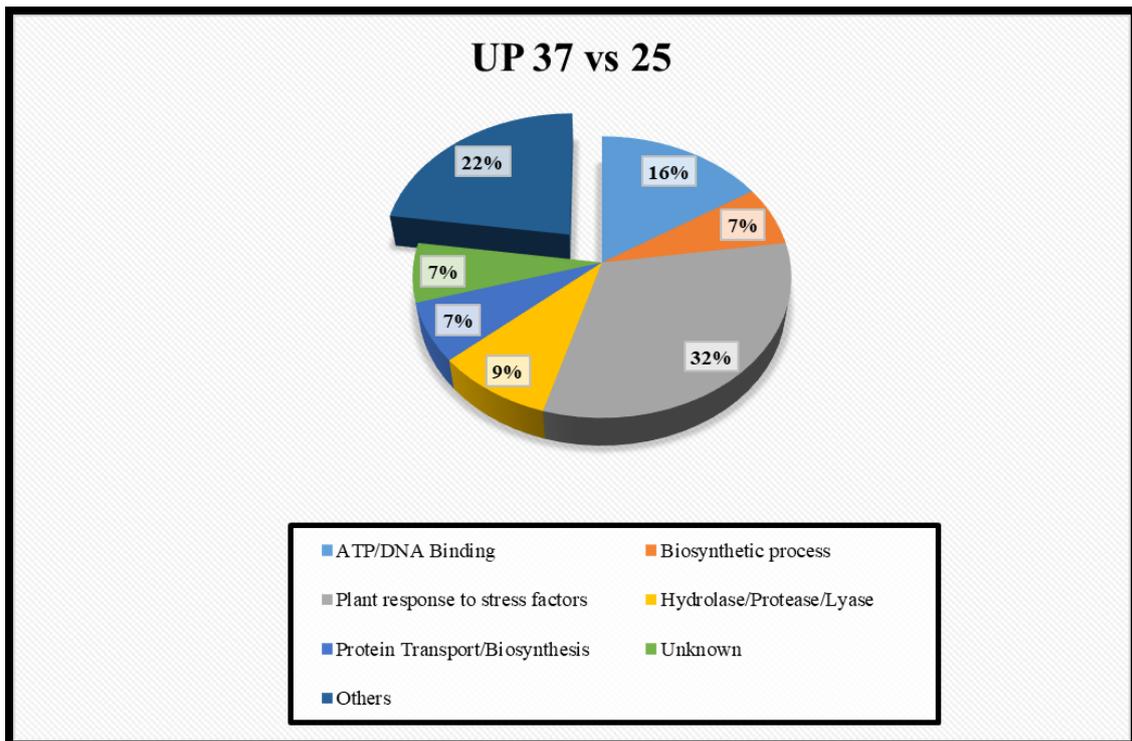
Nas plantas em recuperação foram contabilizadas 100 proteínas como sendo menos abundantes comparando com o controlo a 25°C (Figura 20). Novamente a categoria proteica com maior representatividade foi a que corresponde às respostas de defesa da planta contra o stress, com 23 proteínas (23%). Mecanismos de transporte e Hidrólise/Protéase/Lease foram os segundos grupos de proteínas menos abundantes no período de recuperação, comparativamente ao controlo, tendo sido contabilizadas 11 proteínas para cada categoria (11%) (Figura 20).



**Figura 20-** Categorização ontológica das proteínas menos abundantes em *C. canephora* no período de recuperação em comparação com o controlo a 25°C.

#### 4.3.3. Ontologia das proteínas diferenciais mais abundantes em *C. arabica*

Foram contabilizadas 44 proteínas mais abundantes a 37°C, 14 das quais se encontram envolvidas em resposta ao stress, o que equivale a 32% da amostra total (Figura 21). Com alguma relevância registou-se ainda proteínas associadas a ligações de ATP e DNA, totalizando 14 proteínas (16% da amostragem), seguida de proteínas envolvidas em mecanismos biológicos de rutura ou remoção, como é o caso da Hidrolise, Protéase e Liase com 9% das proteínas (Figura 21).

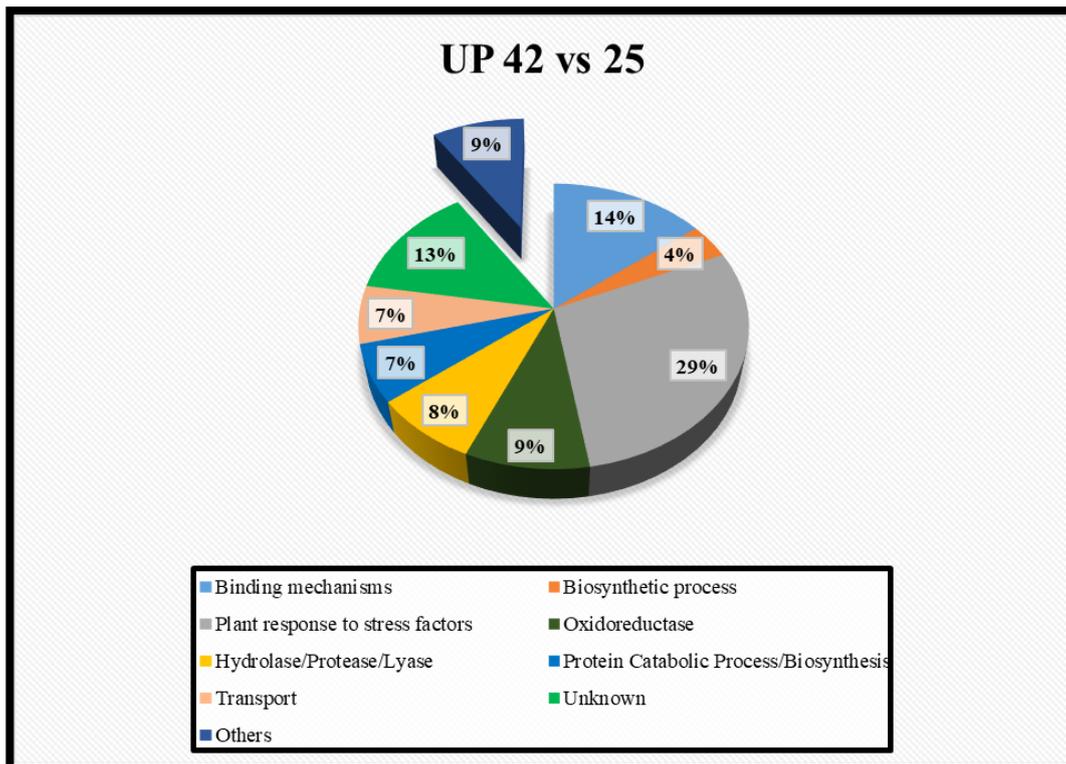


**Figura 21-** Categorização ontológica das proteínas mais abundantes em *C. arabica* a 37°C em comparação com o controle a 25°C.

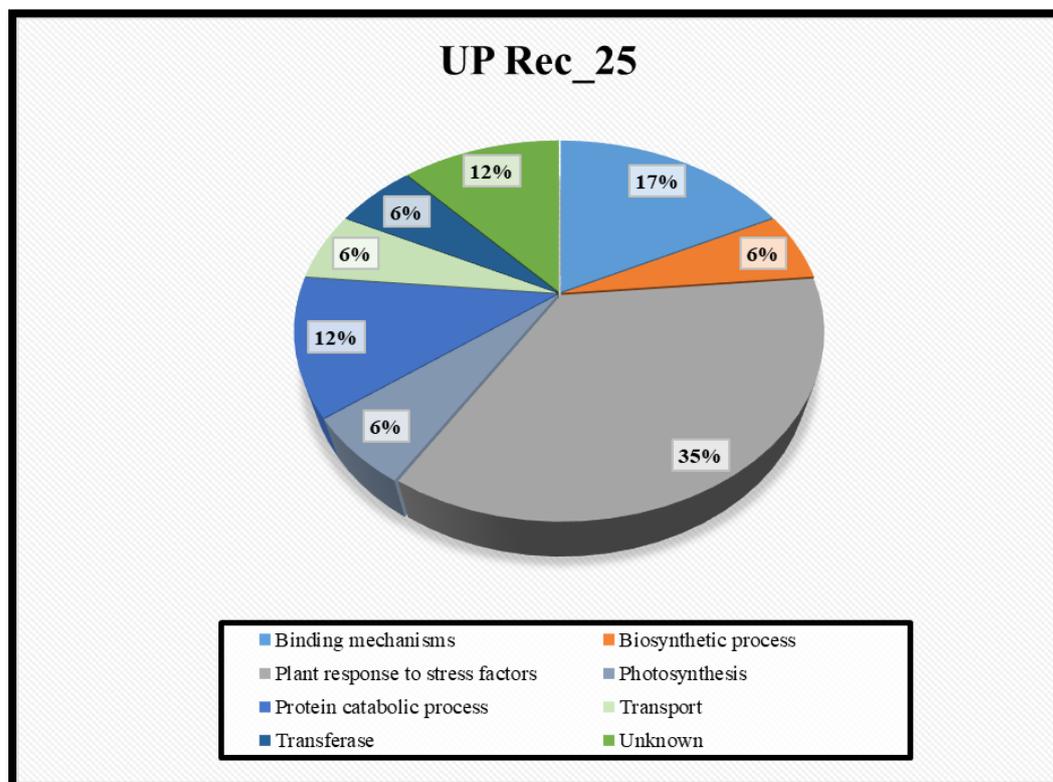
A 42°C, 76 proteínas foram mais abundantes, das quais 29%, ou seja, 22 proteínas encontram-se diretamente associadas a respostas ao stress (Figura 22).

Processos relacionados a ligações biológicas apresentaram uma cota de 14%, o que corresponde a 11 proteínas. Proteínas associadas à oxidorredutase apresentam uma representatividade de 9%, com 7 proteínas representativas desta categoria ontológica (Figura 22).

Nas plantas em recuperação, registaram-se 17 proteínas mais abundantes, estando a maioria novamente associada a funções de resposta da planta a fatores de stress (6 proteínas, com uma representatividade de 35%). A segunda categoria mais relevante está associada a ligações biológicas com 3 proteínas contabilizadas e uma preponderância de 17% (Figura 23).



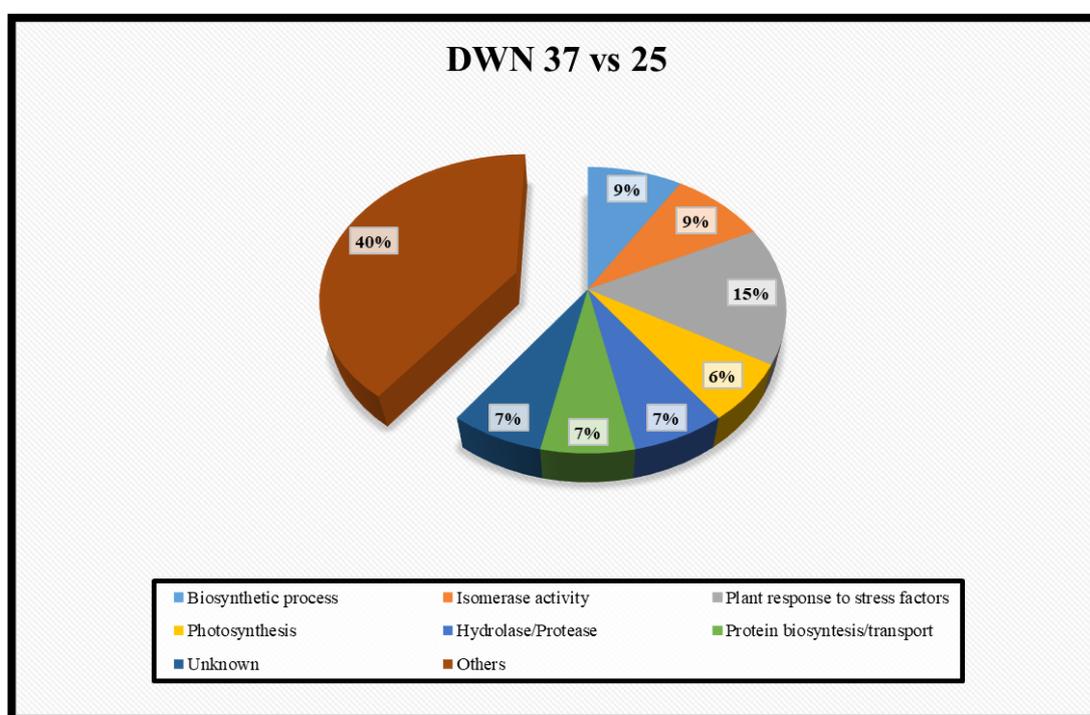
**Figura 22-** Categorização ontológica das proteínas menos abundantes em *C. arabica* a 42°C em comparação com o controlo a 25°C.



**Figura 23-** Categorização ontológica das proteínas mais abundantes em *C. arabica* no período de recuperação em comparação com o controlo a 25°C.

#### 4.3.4. Ontologia das proteínas diferenciais menos abundantes em *C. arabica*

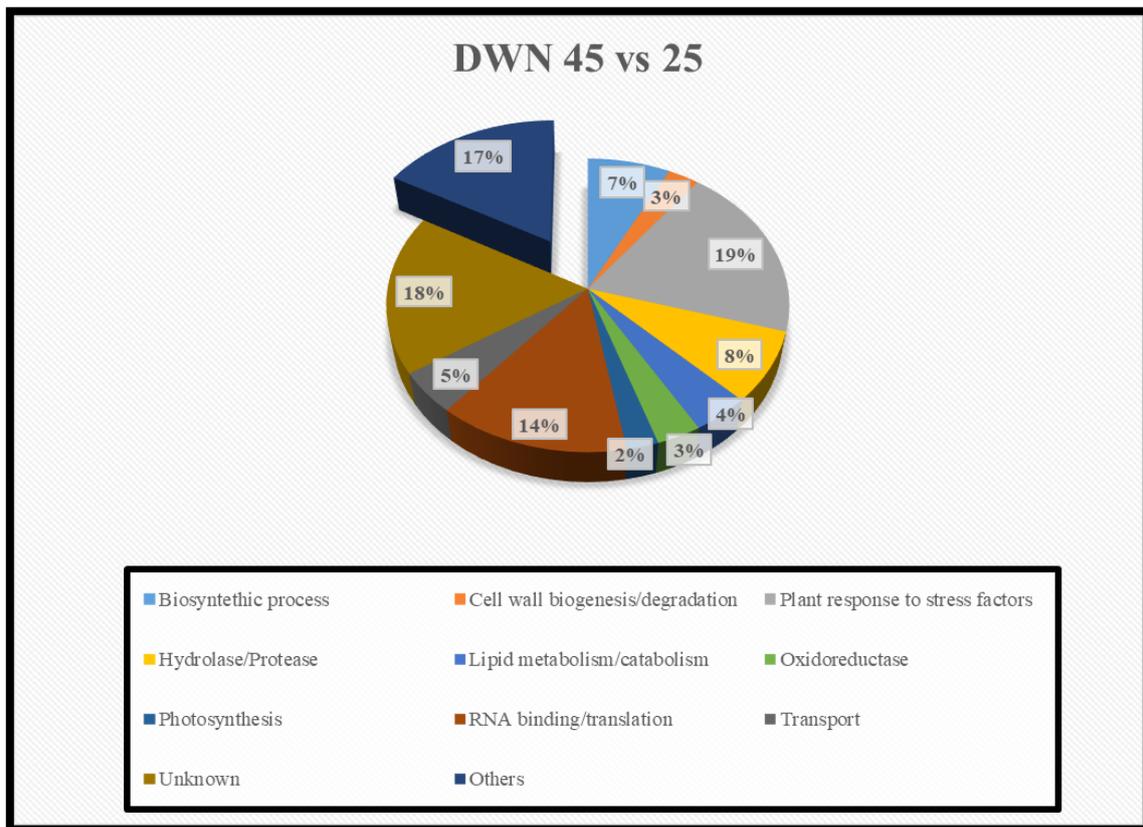
Foram contabilizadas 45 proteínas menos abundantes a 37°C, das quais apenas 7 estão envolvidas na resposta ao stress, o que equivale a 15% da amostra total (Figura 24). Outras duas categorias de proteínas mais reprimidas em relação ao controlo incluem os processos biossintéticos ou de biossíntese de diversos componentes da planta, com 4 proteínas representativas, o que equivale a uma proporção de 9%. A outra categoria que apresenta a mesma proporção que a anterior é a associada à atividade da isomerase. A fotossíntese também aparece representada com 3 proteínas (Figura 24).



**Figura 24-** Categorização ontológica das proteínas menos abundantes em *C. arabica* a 37°C em comparação com o controlo a 25°C.

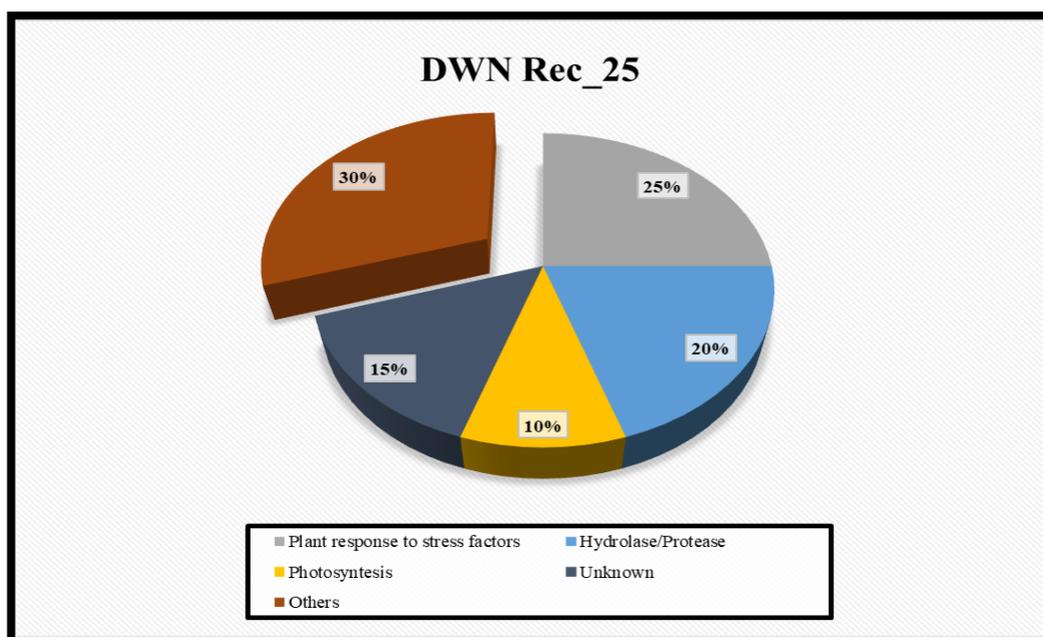
Foram contabilizadas 216 proteínas como sendo menos abundantes no proteoma das plantas submetidas ao tratamento térmico a 42°C, comparando com o controlo a 25°C (Figura 25). A categoria de proteínas com maior representatividade neste estudo foi a que controla a resposta das plantas aos fatores de stress com 42 proteínas (33%), seguida de proteínas responsáveis por atividades relacionadas com ligações de RNA e tradução com 30 proteínas (14%). Outro dado relevante para o estudo foram as proteínas relacionadas com a Hidrólase e a Protéase, com uma relevância de 8% (17 proteínas pertencentes a este grupo). Este foi o

ensaio onde foram reconhecidas mais proteínas, incluindo as de classificação ontológica desconhecida, que contabilizaram 38 proteínas (18% do total de proteínas analisadas) (Figura 25).



**Figura 25-** Categorização ontológica das proteínas menos abundantes em *C. arabica* a 42°C em comparação com o controle a 25°C.

Finalmente nas plantas em período de recuperação, foram contabilizadas 20 proteínas menos abundantes relativamente ao controlo, das quais 5 (25%) estavam associadas a respostas da planta ao stress sofrido (Figura 26). As categorias de Hidrólase e Protéase apresentaram valores elevados em termos proporcionais com uma abrangência de 20% face à totalidade das proteínas analisadas. Adicionalmente, a fotossíntese também apareceu registada em 10% dessas proteínas, sendo dos poucos ensaios onde se verificou estes valores percentuais associados a processos de fotossíntese (Figura 26).



**Figura 26-** Categorização ontológica das proteínas menos abundantes em *C. arabica* no período de recuperação em comparação com o controle a 25°C.

#### 4.4. Análise específica das proteínas associadas a respostas a fatores de stress relacionadas com calor por parte da planta do café nas variedades em estudo

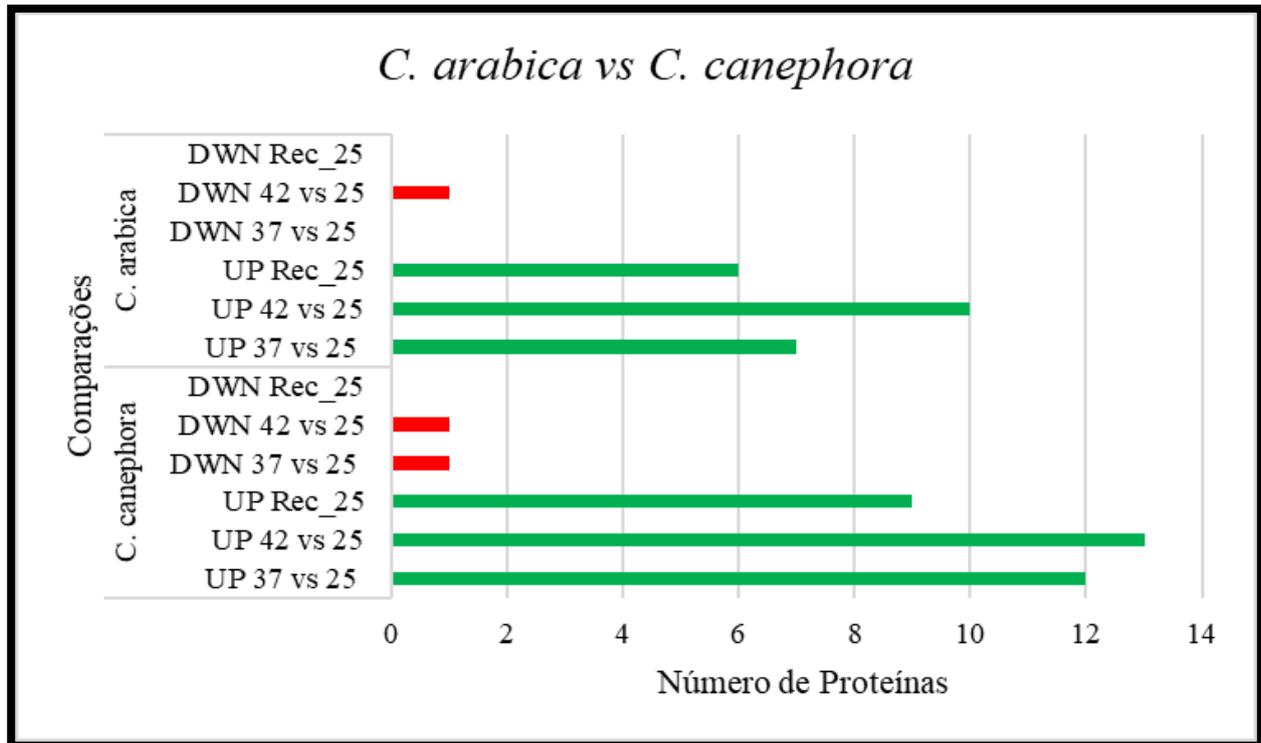
Diversas proteínas foram categorizadas como sendo respostas da planta a fatores de stress. Para o estudo realizado nesta dissertação o interesse maior passa por quantificar quais as proteínas que apresentam uma resposta direta ao stress causado pela ação do calor.

Deste modo na Figura 27 é possível observar que em termos de abundância negativa o número de proteínas com as funções de resposta ao stress térmico nas plantas a 25°C comparativamente com os tratamentos a 37°C, 42°C e no período de recuperação é menor, sendo contabilizadas apenas observações de valor 0, quer na variedade *C. canephora*, quer na variedade *C. arabica*. (Figura 27).

Ao realizar uma observação mais detalhada é possível verificar uma maior abundância de proteínas com ação de resposta ao stress térmico nos ensaios com a temperatura mais elevada (42°C) em ambas as variedades, sendo que a variedade *C. canephora* apresenta o maior teor de proteínas, contabilizando 13 para esta temperatura (Figura 27).

Analisando o valor total de proteínas com resposta ao stress térmico por variedade é obtida a informação de que nas plantas da variedade *C. canephora* foram obtidas 36 proteínas, já para a variedade *C. arabica* apenas 24 proteínas, isto reflete uma diferença de

43% de resposta ao stress térmico por parte destas variedades. Importante ainda referir que entre comparações diretas de abundância proteica nas variedades em estudo, se verificou sempre uma superioridade neste quesito por parte da variedade *C. canephora* (Figura 27).



**Figura 27-** Contabilização de proteínas diretamente relacionadas com respostas da planta ao stress térmico nas variedades *C. arabica* e *C. canephora* após os distintos tratamentos de calor.

## 5. Discussão

### 5.1. Relevância da proteômica na cultura do café

Conseguir detetar, quantificar e caracterizar proteínas que são reguladas em diversos genótipos de espécies de plantas é de extrema relevância para entender e tentar prever como cada planta irá reagir a estímulos ambientais diversos. Mesmo sendo o café uma cultura de extrema importância, os estudos relacionados com o proteoma do café estão longe de estar num patamar avançado, sendo que até aos dias de hoje os estudos abrangentes do proteoma do café são escassos. No caso da influência da temperatura, esta dissertação aporta os primeiros resultados sobre o seu impacto no proteoma do café, considerando duas variedades das duas espécies mais importantes no comércio do café: *C. canephora* e *C. arabica*.

### 5.2. Caracterização e funcionalidade do proteoma da folha de café

Utilizando o genoma de referência de *C. canephora* (Denoeud et al., 2014) foram atribuídos a péptidos um total de 377 285 espectros, o que representa um número bastante elevado de proteínas, considerando os estudos proteómicos efetuados noutras plantas (Cao et al., 2017). No entanto, o proteoma do café é dominado por apenas 22 proteínas que contribuem para os 20% da biomassa do proteoma das plantas de *C. canephora* (sendo que destas, 18 fazem parte também da biomassa do proteoma de *C. arabica*), semelhante ao encontrado noutros eucariotas (Agrawal et al., 2013; Casas-Vila et al., 2017).

A classificação funcional das proteínas mais dominantes revela uma elevada similaridade de funções entre os dois genótipos em estudo. Das 22 proteínas em estudo apenas 3 proteínas apresentavam uma diferença significativa no peso relativo das mesmas em relação ao contributo para a %NSAF da variedade, ou seja, para a biomassa do proteoma do genótipo (Quadro 3), o que também se verifica em análises fisiológicas e moleculares sob as mesmas condições experimentais utilizadas neste estudo e onde foi observada uma resposta comum (Semedo et al., 2021; Marques et al., 2020; 2021).

A proteína com maior preponderância para ambas as %NSAF foi a proteína *Auxin binding protein ABP20*, seguida da proteína *Oxygen-evolving enhancer protein 1*, sendo a primeira um regulador essencial em termos do desenvolvimento da planta (Zhu et al., 2001) e a segunda, um agente chave no processo da fotossíntese, estando presente em funções

como a estabilização e a montagem do fotossistema II, foto-inibição e fotossíntese (Sugihara et al., 2000). A síntese de DNA, RNA e proteínas e a fotossíntese apresentam um caráter essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta do café (Sultana et al., 2020). Estes processos estão presentes direta ou indiretamente no Quadro 3; em específico 14 proteínas associadas a funções fotossintéticas, o que leva a crer que estes genótipos em estudo apresentam uma grande capacidade de lidar com alterações ambientais quando comparadas com outros genótipos de café previamente estudados (Semedo et al., 2021).

### **5.3. Respostas diferenciais à temperatura pelos genótipos *C. canephora* e *C. arabica***

Observou-se um aumento na síntese de proteínas diferencialmente abundantes (PDAs) em ambas as temperaturas para ambos os genótipos, essencialmente a 42°C onde se verificou o pico de regulação quer para cima (UP), quer para baixo (DWN) na expressão proteica (Howarth & Ougham, 1993). A regulação negativa apresenta-se mais elevada para plantas do genótipo *C. arabica* quando submetidas a 42°C. Tal implica que este genótipo sofre uma forte repressão proteica nesta amplitude térmica, o mesmo se verifica em *C. canephora* mas a uma escala mais reduzida (Figura 12). Estudos comparativos entre genótipos e espécies de café são bastante escassos sendo que os poucos existentes também referem que *C. canephora* possui alguma tolerância ao stress abiótico através do enriquecimento de genes metabólicos de compostos, conhecidos como genes antioxidantes, estes genes possuem um papel importante na resposta do café a situações de stress o que explica a menor regulação negativa por parte deste genótipo (Martins et al, 2016; Bertrand B. et al., 2015).

A temperaturas de 42°C foi revelado um enriquecimento na regulação positiva nos mecanismos de ligação, mais propriamente *ATP-Binding*, sendo esta verificada essencialmente em *C. arabica* (Figura 20), estando também presentes em *C. canephora*. Isto vai de encontro com estudos recentes realizados nas culturas do arroz, trigo e milho (Fernandes et al., 2008; Liu et al., 2015; Zhang et al., 2013) sugerindo que o stress relacionado com a temperatura tem um efeito geral de resposta conservativa em todas as linhagens de plantas, onde a ligação e a capacidade de dobra (*foldng*) têm um papel essencial na forma como a planta lida com stress.

Em relação à Fotossíntese, em *C. canephora* é verificada uma regulação positiva causada por temperaturas até aos 42°C e durante o período de recuperação, com algumas proteínas a exercer funções diretas ou indiretas neste mecanismo como é o caso da

*Protochlorophyllide reductase* que está diretamente relacionada quer com o processo da fotossíntese, mas também tem parte ativa na síntese de clorofila, o que indica uma clara tentativa de resposta ao stress por parte deste genótipo. Já em *C. arabica* verifica-se uma regulação negativa por parte da planta aos mecanismos de fotossíntese a partir dos 42°C e no período de repouso (não sendo visível a 37°C). Deste modo confirma-se que em *C. canephora* ocorre uma regulação positiva na fotossíntese até mesmo nos 42°C, demonstrando assim a capacidade desta variedade apresentar resiliência ao stress térmico. Já em relação a *C. arabica* a regulação negativa verificada ocorre a 42°C e no período de recuperação, não ocorrendo portanto uma tentativa tão interessante por parte desta variedade no combate ao stress térmico através da ativação de mecanismos fotossintéticos (Dubberstein et al., 2020).

Foi possível aferir uma relação de inibição de proteínas relacionadas com a oxidoredutase a temperaturas de 42°C e em período de recuperação especialmente em *C. canephora* atuando em doadores emparelhados com incorporação ou redução de oxigénio molecular.

Um ponto importante neste estudo é que as plantas de café foram gradualmente expostas a temperaturas mais elevadas, permitindo-lhes expressar as suas capacidades de aclimação sob 37°C (e, em parte, 39°C). Essa capacidade intrínseca de adquirir termo tolerância contribuiu para a homeostase metabólica, mesmo em ambientes com condições variadas, explicando assim a razão desses genótipos se comportarem melhor sob temperaturas elevadas do que o esperado em relatórios clássicos (Damatta et al., 2018).

Foram identificadas em diversas temperaturas mecanismos relacionados com o transporte, quer proteico, quer de componentes celulares ou biossintéticos. Este transporte é verificado essencialmente em *C. canephora* onde em todas as temperaturas são identificadas proteínas com estas funções em termos de regulação positiva. Já em *C. arabica*, isto é verificado maioritariamente na temperatura de 42°C e no período de recuperação ao tratamento térmico que ocorre essencialmente como resposta ao stress sofrido pela planta (Marques et al., 2021).

Ao analisar diversas proteínas relacionadas com a regulação das paredes celulares das células vegetais (em termos de biogénese ou degradação das mesmas), verificamos uma repressão elevada da produção destas quando atingidas temperaturas elevadas, sendo esta repressão mais verificada a 42°C em ambos os genótipos, esta informação vai de encontro com estudos que indicam a necessidade da planta de manter a estabilidade celular ao serem submetidas a níveis de stress térmico elevados (Behr et al., 2015).

Detetou-se a presença de RuBisco em estudos de regulação positiva para ambos os genótipos a temperaturas de 37°C e 42°C, não tendo sido observada esta proteína no período de recuperação da planta ao stress térmico, esta descoberta vai de encontro com a ausência de uma aclimação fotossintética por parte das plantas quando submetidas ao calor, sendo visível então esta atividade da enzima RuBisco como defesa ao stress (Ramalho et al., 2013; Rodrigues et al., 2016).

#### **5.4. Presença de proteínas responsáveis por respostas diretas ao stress térmico**

Foi possível verificar que proteínas que apresentam resposta direta a fatores de stress foram as mais contabilizadas quando foram estudadas as PDAs, assim é importante referir que esta categorização ontológica é bastante ampla, o que criou a necessidade de especificar mais que resposta foi efetuada e contra o quê. Primeiramente, a categorização que engloba estas respostas também envolve respostas de defesa gerais da planta que não foram categorizadas em relação a um fator em específico. Os fatores de stress biótico e abiótico foram diversos, como fungos, frio, calor, salinidade, privação de água, entre outros.

Ao categorizar de maneira mais específica estas proteínas foi obtida uma informação muito interessante para este estudo (Figura 25). Onde se verificaram mais proteínas com resposta direta a fatores de stress térmico, foi nos ensaios “UP”, ou seja, aqueles que contabilizam as proteínas mais abundantes nas plantas após serem submetidas às diferentes gamas de temperaturas, sendo a temperatura de maior reação a de 42°C. O genótipo que apresentou uma resposta ligeiramente superior ao stress térmico foi o *C. canephora*, o que leva a crer, que em comparação direta entre genótipos este terá uma melhor resposta ao calor.

De entre o leque de proteínas analisadas neste âmbito as que mais são representativas são as *Heat Shock Proteins*, tratando-se de proteínas produzidas pelas células em resposta a condições stressantes por um dado organismo, não sendo uma proteína exclusiva das plantas. Estas plantas desempenham uma função de extrema importância na resposta ao stress, para além destas, as proteínas ainda conferem uma melhoria significativa às membranas celulares assim como desintoxicam espécies reativas ao oxigénio (ROS), como é o caso das plantas (UI Haq et al., 2019). Por forma a melhor explicar esta resposta torna-se importante referir que a função de cada proteína é determinada pela sua formação e pelo seu dobramento numa estrutura tridimensional (Levitt et al., 1997). Esta formação numa estrutura tridimensional requer 50% de sequências de aminoácidos principais (Dobson et al., 1998). É aqui que a função de dobramento por parte das HSPs é

importante. As HSPs protegem as células de se danificarem e facilita a recuperação e a sobrevivência das mesmas, de modo a poderem voltar a condições normais de crescimento (Morimoto & Santoro, 1998).

A aclimação das plantas através do aumento progressivo da temperatura permitiu a estas HSPs ativarem mecanismos de proteção que provavelmente não ocorreriam se a mudança de temperatura tivesse um caráter mais repentino (Al-Whaibi, 2011). No estudo efetuado verificou-se a presença de proteínas com a denominação de *chaperones* em todos os tratamentos térmicos para ambos os genótipos. Um exemplo de *chaperone* identificado, foi *Chaperone protein ClpB3, chloroplastic* com funções essenciais para a planta em stress, como o desenvolvimento do cloroplasto e o controlo da viabilidade das sementes, para além disso medeia a formação da membrana interna de tilacoides e confere termotolerância aos cloroplastos durante o stress térmico (Lee et al., 2007; Myouga et al., 2006). HSPs com pesos moleculares a variar dos 10 aos 200 KD são caracterizadas como *chaperones* moleculares regulando o dobramento e acumulação de proteínas, assim como a localização e degradação das mesmas em todas as espécies de plantas quando as estas são submetidas a situações de stress elevado (Feder & Hofmann, 1999; Gupta et al., 2010; Panaretou & Zhai, 2008).

Foram maioritariamente identificados nos diferentes tratamentos térmicos para ambos os genótipos HSPs com as seguintes classificações: Hsp70 ou sHsp (Hsp70 apresenta peso molecular a rondar os 70 KD e os sHsp ou Small Hsp possuem pesos moleculares baixos) (Al-Whaibi, 2011). Os Hsp70 e os sHsp atuam principalmente como *chaperones*, como já foi referido acima, com funções específicas de proteção ao stress para novas proteínas sintetizadas (Rousch et al., 2004), prevenindo a sua acumulação, agregando e dobrando as mesmas de maneira adequada a serem transferidas para o local final onde exerceram as suas funções (Su & Li, 2008; Sung et al., 2001).

É importante lembrar que não só através de HSPs e *chaperones* se obtêm informações relevantes face à resposta por parte da planta ao stress, de facto, na planta do café existem diversos mecanismos de defesa frequentemente associados à fortificação da capacidade do sistema antioxidante (alguns destes foram brevemente retratados no subcapítulo anterior), incluindo enzimas (e.g., catalases, *superoxide dismutase*, peroxidase) e componentes não enzimáticos (e.g., ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocopherol, RFOs) (Gill and Tuteja, 2010; Ramalho et al., 2014b; Chen et al., 2016), complementados com mecanismos de dissipação térmica (e.g., carotenoides foto protetivos) e fluxo cíclico de eletrões (CEF) envolvendo fotossistemas I (PS) e/ou II (Miyake and Okamura 2003, Dubberstein et al. 2020; Smedo et al., 2021). Juntos, estes mecanismos de defesa contribuem para a manutenção do balanço energético e homeostase oxidativa celular.

É possível perceber que existe uma maquinaria muito forte de defesa contra o calor nestes dois genótipos, pois quer em regulação negativa quer positiva a categoria com mais relevância ao longo de todos os resultados é a resposta da planta aos fatores de stress. Isto indica que estes genótipos estão munidos de respostas ao stress, quer quando submetidas a temperaturas elevadas, quer em condições normais de desenvolvimento.

## 5.5 Importância destes resultados para a indústria do café

O café teve um papel transformador ao longo da nossa história, especialmente após o século 20, sendo esta a época onde a maioria das variedades foi criada para atender a uma demanda mundial crescente de consumo de café (ICO, 2010). No entanto, o melhoramento do café é amplamente restrito a apenas duas espécies - o poliploide *C. arabica* e um dos seus ancestrais, o diploide *C. canephora*, que juntos representam a grande maioria da produção mundial (DaMatta & Cochicho Ramalho, 2006). É, portanto, importante procurar criar uma próxima geração de cultivares de café adaptadas aos futuros impactos climáticos que desde já se vêm a sentir, desbloqueando assim características de resiliência e, ao mesmo tempo, mantendo a produtividade global e a alta qualidade dos grãos de café. Devido ao posicionamento geográfico das áreas de maior produção de café serem as mais impactadas com o aquecimento global, pode se colocar em risco a viabilidade e sustentabilidade desta cultura para todo o mundo (Magrach & Ghazoul, 2015; Zullo et al., 2011). Deste modo, estudos como este de comparação de genótipos de café quando expostos a temperaturas mais elevadas são prioritários nos programas de melhoramento do café (Damatta et al., 2018; Marie et al., 2020) para garantir a sustentabilidade de toda a cadeia de valor deste produto agrícola tropical consumido mundialmente.

Neste estudo foram obtidas novas pistas em como o proteoma de *C. canephora* e *C. arabica* pode ser aclimatado para corresponder aos desafios climáticos futuros, através da exploração dos efeitos das temperaturas elevadas. Ambas plantas de *C. canephora* e *C. arabica*, apresentaram uma resposta de tolerância intrínseca a 37°C, o que é realmente acima do que se assume em plantas sujeitas a estas temperaturas (Dubberstein et al., 2020; Mofatto et al., 2016), sendo que a 42°C se verificou um impacto mais expressivo em *C. arabica*. Estes estudos, portanto, revelam um efeito menos expressivo em *C. canephora*, quando comparada diretamente com *C. arabica*.

Ambos os genótipos apresentaram uma boa capacidade de resposta ao stress térmico, assim é expectável que o melhoramento da espécie do café passe certamente pela utilização destes dois genótipos no futuro. Assim sendo, juntamente com estudos fisiológicos e bioquímicos anteriores, este estudo proteómico fornece evidências de respostas de aclimação que sustentam processos-chave para a aclimação do café a temperaturas extremas.

## 6. Conclusões

Apesar da temperatura apresentar algum impacto sobre o proteoma das folhas em ambos os genótipos de café estudados nesta dissertação, é possível verificar uma resposta positiva em ambos os genótipos até à temperatura de 37°C. Em 42°C, a repressão proteica foi superior em *C. arabica*, revelando-se assim uma maior capacidade de aclimação ao calor por parte de *C. canephora*. Além disso também se observou uma regulação positiva de proteínas associadas à fotossíntese no proteoma de *C. canephora* mesmo a 42°C. Em *C. arabica* não se verificou esta resposta positiva, mesmo após as plantas passarem pelo ensaio de 37°C.

A capacidade de resposta ao stress térmico por parte destes genótipos foi também corroborada pela presença de *Heat Shock Proteins*, sendo estas mais abundantes a 42°C. As HSPs são de extrema relevância para os mecanismos de resiliência das plantas pois atuam como *chaperones*, ou seja, possuem uma capacidade intrínseca de defender as proteínas recém sintetizadas (e não só). Ao efetuarem uma dobragem (*fold*ing) das proteínas, as HSPs impedem a desnaturação de enzimas e proteínas que são também responsáveis por respostas metabólicas secundárias ao stress, auxiliando as mesmas no transporte até ao local onde as suas funções são essenciais para a planta. As HSPs foram também mais abundantes em *C. canephora*, o que corrobora a restante análise comparativa realizada ao longo desta dissertação entre os genótipos em estudo.

Apesar da resposta proteica de mecanismos de resiliência ao stress térmico ser ligeiramente maior *C. canephora* do que em *C. arabica* é importante referir que as respostas de tolerância térmica nos genótipos estudados nesta dissertação são bastante superiores quando comparados com outras variedades submetidas aos mesmos stresses. Neste contexto, importa salientar os resultados aqui apresentados como uma contribuição para futuros programas de melhoramento, garantindo a sustentabilidade da indústria do café.

## 7. Bibliografia

- Agrawal, G. K., Sarkar, A., Righetti, P. G., Pedreschi, R., Carpentier, S., Wang, T. (2013). *A decade of plant proteomics and mass spectrometry: translation of technical advancements to food security and safety issues. Mass Spectrom.* 335–365.
- Agrawal, G. K., Jacques Bourguignon, N. R., Geneviève Ephritikhine, Myriam Ferro, Michel Jaquinod, Konstantinos G. Alexiou, Thierry Chardot, N. C., & Pascale Jolivet, John H. Doonan, R. R. (2011). *PLANT ORGANELLE PROTEOMICS: COLLABORATING FOR OPTIMAL CELL FUNCTION.* 82.
- Ahmad, P., Abdel Latef, A. A. H., Rasool, S., Akram, N. A., Ashraf, M., & Guzel, S. (2016). Role of proteomics in crop stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01336>
- Al-Wahaibi, M. H. (2011). Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University - Science*, 23(2), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022>
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and their applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., ... Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303–321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., ... Zhang, J. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Behr, M., Legay, S., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2015). Analysis of cell wall-related genes in organs of *Medicago sativa* L. Under different abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 16104–16124. <https://doi.org/10.3390/ijms160716104>
- Bertrand, B., Bardil, A., Baraille, H., Dussert, S., Doulebeau, S., Dubois, E., ... & Etienne, H. (2015). The greater phenotypic homeostasis of the allopolyploid *Coffea arabica* improved the transcriptional homeostasis over that of both diploid parents. *Plant and Cell Physiology*, 56(10), 2035-2051.
- Bohnert, H. J., & Cushman, J. C. (2000). The ice plant cometh: Lessons in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(3), 334–346. <https://doi.org/10.1007/s003440000033>
- Bongaarts, J. (2009). Human population growth and the demographic transition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1532), 2985–2990. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0137>
- Brosché, M., Blomster, T., Salojärvi, J., Cui, F., Sipari, N., Leppälä, J., ... Kangasjärvi, J. (2014). Transcriptomics and Functional Genomics of ROS-Induced Cell Death Regulation by RADICAL-INDUCED CELL DEATH1. *PLoS Genetics*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004112>
- Butt, M. S., & Sultan, M. T. (2011). Coffee and its consumption: Benefits and risks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 363–373. <https://doi.org/10.1080/10408390903586412>

- Cao, J., Packer, J. S., Ramani, V., Cusanovich, D. A., Huynh, C., Daza, R., ... Shendure, J. (2017). Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science*, 357(6352), 661–667. <https://doi.org/10.1126/science.aam8940>
- Casal, J. J., & Balasubramanian, S. (2019). *Thermomorphogenesis*. 1–26.
- Casas-Vila, N., Bluhm, A., Sayols, S., Dinges, N., Dejung, M., Altenhein, T., ... Butter, F. (2017). The developmental proteome of *Drosophila melanogaster*. *Genome research*, 27(7), 1273–1285.
- Casey, G., Shayegh, S., Moreno-Cruz, J., Bunzl, M., Galor, O., & Caldeira, K. (2019). The impact of climate change on fertility. *Environmental Research Letters*, 14(5). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab0843>
- Ceccon, E. (2008). Plant productivity and environment. *New forests*, 35(3), 443–448. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622006000500012>
- Chen, Y. E., Liu, W. J., Su, Y. Q., Cui, J. M., Zhang, Z. W., Yuan, M., ... & Yuan, S. (2016). Different response of photosystem II to short and long-term drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 158(2), 225-235.
- Cho, W. C. S. (2007). Proteomics Technologies and Challenges From Genomics to Proteomics. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 5(2), 77–85.
- Crist, E., Mora, C., & Engelman, R. (2017). The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. *Science*, 264(April), 260–264.
- Cristancho, M. A., Caicedo, B. L. C., & Rivillas, C. A. (2016). Compendium of Coffee Diseases and Pests. *Compendium of Coffee Diseases and Pests*. <https://doi.org/10.1094/9780890544723>
- CTA. (2003). *The Profile of Ethiopian Coffee*. Addis Ababa (Coffee and Tea Authority).
- Czarniecka-Skubina, E., Pielak, M., Sałek, P., Korzeniowska-Ginter, R., & Owczarek, T. (2021). Consumer choices and habits related to coffee consumption by poles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph18083948>
- Damatta, F. M., Avila, R. T., Cardoso, A. A., Martins, S. C. V., & Ramalho, J. C. (2018). Physiological and Agronomic Performance of the Coffee Crop in the Context of Climate Change and Global Warming: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(21), 5264–5274. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04537>
- DaMatta, F. M., & Cochicho Ramalho, J. D. (2006). Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 55–81. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100006>
- Davis, A. P., Chadburn, H., Moat, J., O'Sullivan, R., Hargreaves, S., & Lughadha, E. N. (2019). High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. *Science Advances*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav3473>
- De Camargo, Â. P., & De Camargo, M. B. P. (2001). Definição e Esquematização das Fases Fenológicas do Cafeeiro Arábica nas Condições Tropicais do Brasil. *Bragantia*, 60(1), 65–68.
- De Luca, S., De Filippis, M., Bucci, R., Magrì, A. D., Magrì, A. L., & Marini, F. (2016). Characterization of the effects of different roasting conditions on coffee samples of different geographical origins by HPLC-DAD, NIR and chemometrics. *Microchemical Journal*, 129, 348–361. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.07.021>
- Denoëud, F., Carretero-Paulet, L., Dereeper, A., Droc, G., Guyot, R., Pietrella, M., ...

- Lashermes, P. (2014). The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, 345(6201), 1181–1184. <https://doi.org/10.1126/science.1255274>
- Dobson, C. M., Šali, A., & Karplus, M. (1998). Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angewandte Chemie - International Edition*, 37(7), 868–893. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980420\)37:7<868::AID-ANIE868>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980420)37:7<868::AID-ANIE868>3.0.CO;2-H)
- Dubberstein, D., Lidon, F. C., Rodrigues, A. P., Semedo, J. N., Marques, I., Rodrigues, W. P., ... Ramalho, J. C. (2020). Resilient and Sensitive Key Points of the Photosynthetic Machinery of Coffea spp. to the Single and Superimposed Exposure to Severe Drought and Heat Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 11(July), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01049>
- FAO. (2009). *How to Feed the World by 2050*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farah, A., & Dos Santos, T. F. (2015). The Coffee Plant and Beans: An Introduction. *Em Coffee in Health and Disease Prevention*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2>
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243–282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>
- Fernandes, J., Morrow, D. J., Casati, P., & Walbot, V. (2008). Distinctive transcriptome responses to adverse environmental conditions in Zea mays L. *Plant Biotechnology Journal*, 6(8), 782–798. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00360.x>
- Fischer, G., Shah, M., & Velthuisen, H. van. (2002). Climate change and agricultural vulnerability. *Em International Institute for Applied Systems Analysis (IIASA)*.
- Graaff, J. de. (1986). *Economics of crops in developing countries No 1. The economics of coffee*. (1), 62–63.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sciences*, 86(11–12), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.12.015>
- Hakeem, K. R., Tombuloğlu, H., & Tombuloğlu, G. (2016). Plant omics: Trends and applications. *Em Plant Omics: Trends and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31703-8>
- Hamon, P., Grover, C. E., Davis, A. P., Rakotomalala, J. J., Raharimalala, N. E., Albert, V. A., ... Guyot, R. (2017). Genotyping-by-sequencing provides the first well-resolved phylogeny for coffee (Coffea) and insights into the evolution of caffeine content in its species: GBS coffee phylogeny and the evolution of caffeine content. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.02.009>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9643–9684. <https://doi.org/10.3390/ijms14059643>
- Hindorf, H., & Omondi, C. O. (2011). A review of three major fungal diseases of Coffea arabica L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of Advanced Research*, 2(2), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.08.006>

- Hossain, Z., Nouri, M. Z., & Komatsu, S. (2012). Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. *Journal of Proteome Research*, 11(1), 37–48. <https://doi.org/10.1021/pr200863r>
- HOWARTH, C. J., & OUGHAM, H. J. (1993). Gene expression under temperature stress. *New Phytologist*, 125(1), 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03862.x>
- Hu, J., Rampitsch, C., & Bykova, N. V. (2015). Advances in plant proteomics toward improvement of crop productivity and stress resistance. *Frontiers in Plant Science*, 6(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00209>
- ICO. (2010). *ICO Annual Review 2010/11*. 1–36.
- Ingolia, N. T. (2014). Ribosome profiling: New views of translation, from single codons to genome scale. *Nature Reviews Genetics*, 15(3), 205–213. <https://doi.org/10.1038/nrg3645>
- Jie, C., Jing-zhang, C., Man-zhi, T., & Zi-tong, G. (2002). Soil degradation: a global problem endangering sustainable development. *Journal of Geographical Sciences*, 12(2), 243–252. <https://doi.org/10.1007/bf02837480>
- Kalschne, D. L., Viegas, M. C., De Conti, A. J., Corso, M. P., & Benassi, M. de T. (2018). Steam pressure treatment of defective *Coffea canephora* beans improves the volatile profile and sensory acceptance of roasted coffee blends. *Food Research International*, 105, 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.017>
- Komatsu, S., & Hossain, Z. (2013). Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. *Frontiers in Plant Science*, 4(APR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00071>
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593–1608. <https://doi.org/10.1093/jxb/err460>
- Krishnan, S., & Boot, W. (2014). Genetic Characterization of *Coffea arabica* ‘Geisha’ from Panama and Ethiopia. *ASHS Annual Conference*, (March). Obtido de <https://bootcampcoffee.com/wp-content/uploads/2014/01/Geisha-Genetic-Characterization-Final-Report-010614.pdf>
- Lambot, C., Herrera, J. C., Bertrand, B., Sadeghian, S., Benavides, P., & Gaitán, A. (2017). Cultivating Coffee Quality-Terroir and Agro-Ecosystem. Em *The Craft and Science of Coffee*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803520-7.00002-5>
- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology*. Berlin.
- Lawlor, D. (2001). *Photosynthesis* (3rd ed.). Oxford: Bios.
- Leal Filho, W., Laderach, P., Lundy, M., Jarvis, A., Ramirez, J., Portilla, E. P., ... Eitzinger, A. (2011). The Economic, Social and Political Elements of Climate Change. *Change*, (October), 703-723–723. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14776-0>
- Lee, U., Rioflorida, I., Hong, S. W., Larkindale, J., Waters, E. R., & Vierling, E. (2007). The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: Chaperones for stress and chloroplast development. *Plant Journal*, 49(1), 115–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02940.x>
- Levitt, J. (1980). Responses of Plant to Environmental Stress: Water, Radiation, Salt and Other Stresses. *Academic Press*.
- Levitt, M., Gerstein, M., Huang, E., Subbiah, S., & Tsai, J. (1997). Protein folding: The endgame. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 549–579.

<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.549>

- Liu, Z., Xin, M., Qin, J., Peng, H., Ni, Z., Yao, Y., & Sun, Q. (2015). Temporal transcriptome profiling reveals expression partitioning of homeologous genes contributing to heat and drought acclimation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, *15*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0511-8>
- Lockhart, D. J., & Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays [In Process Citation]. *Nature*, *405*(0028-0836 SB-M SB-X), 827–836.
- Maestri, M., Barros, R., & Rena, A. (2001). *Tree Crop Ecosystems* (L. FT, Ed.). Amsterdam: Elsevier Publishers.
- Magrath, A., & Ghazoul, J. (2015). Climate and pest-driven geographic shifts in global coffee production: Implications for forest cover, biodiversity and carbon storage. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133071>
- Marie, L., Abdallah, C., Campa, C., Courtel, P., Bordeaux, M., Navarini, L., ... Bertrand, B. (2020). G × E interactions on yield and quality in *Coffea arabica*: new F1 hybrids outperform American cultivars. *Euphytica*, *216*(5). <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02608-8>
- Marques, I., Fernandes, I., Paulo, O. S., Lidon, F. C., Damatta, F. M., Ramalho, J. C., & Ribeiro-barros, A. I. (2021). A transcriptomic approach to understanding the combined impacts of supra-optimal temperatures and co2 revealed different responses in the polyploid coffee arabica and its diploid progenitor c. *Canephora*. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22063125>
- Marques, I., Fernandes, I., David, P. H., Paulo, O. S., Goulao, L. F., Fortunato, A. S., ... & Ribeiro-Barros, A. I. (2020). Transcriptomic Leaf Profiling Reveals Differential Responses of the Two Most Traded Coffee Species to Elevated [CO<sub>2</sub>]. *International journal of molecular sciences*, *21*(23), 9211.
- Martins, M. Q., Rodrigues, W. P., Fortunato, A. S., Leitao, A. E., Rodrigues, A. P., Pais, I. P., ... & Ramalho, J. C. (2016). Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO<sub>2</sub>] conditions in *Coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 947.
- Matros, A., Kaspar, S., Witzel, K., & Mock, H. P. (2011). Recent progress in liquid chromatography-based separation and label-free quantitative plant proteomics. *Phytochemistry*, *72*(10), 963–974. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.009>
- Megger, D. A., Bracht, T., Meyer, H. E., & Sitek, B. (2013). Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1834*(8), 1581–1590. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.001>
- Mesquita, C., Melo, E., Rezende, J., Carvalho, J., Júnior, M., Moraes, N., ... Araújo, W. (2016). MANUAL DO CAFÉ Implantação de cafezais. *Belo Horizonte, Emater-Mg*, 52. Obtido de [http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/livro\\_implantacao\\_cafezais.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/livro_implantacao_cafezais.pdf)
- Miyake, C., & Okamura, M. (2003). Cyclic electron flow within PSII protects PSII from its photoinhibition in thylakoid membranes from spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, *44*(4), 457-462.
- Moat, J., Williams, J., Baena, S., Wilkinson, T., Gole, T. W., Challa, Z. K., ... Davis, A. P. (2017). Resilience potential of the Ethiopian coffee sector under climate change. *Nature Plants*, *3*(June). <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.81>
- Mofatto, L. S., Carneiro, F. de A., Vieira, N. G., Duarte, K. E., Vidal, R. O., Alekcevetch, J. C., ... Marraccini, P. (2016). Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee

- by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars. *BMC Plant Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0777-5>
- Morimoto, R. I., & Santoro, M. G. (1998). Stress--inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature biotechnology*, 16(9), 833–838.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Myouga, F., Motohashi, R., Kuromori, T., Nagata, N., & Shinozaki, K. (2006). An Arabidopsis chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *Plant Journal*, 48(2), 249–260. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02873.x>
- Nunes, M. A., Ramalho, J. D. C., & Dias, M. A. (1993). Effect of Nitrogen Supply on the Photosynthetic Performance of Leaves from Coffee Plants Exposed to Bright Light. *Journal of Experimental Botany*, 44(262).
- Ornamentais, F. E. P., & Nativas, D. E. P. O. (2008). Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. *Biologia*, (Figura 1), 2002–2008.
- Panaretou, B., & Zhai, C. (2008). The heat shock proteins: Their roles as multi-component machines for protein folding. *Fungal Biology Reviews*, 22(3–4), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.04.002>
- Pandey, A., & Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405(6788), 837–846. <https://doi.org/10.1038/35015709>
- Ramalho, J. C., Rodrigues, A. P., Smedo, J. N., Pais, I. P., Martins, L. D., Simões-Costa, M. C., ... DaMatta, F. M. (2013). Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO<sub>2</sub>]. *PLoS ONE*, 8(12), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082712>
- Ramalho, J. C., Zlatev, Z. S., Leitão, A. E., Pais, I. P., Fortunato, A. S., & Lidon, F. C. (2014). Moderate water stress causes different stomatal and non-stomatal changes in the photosynthetic functioning of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes. *Plant Biology*, 16(1), 133–146.
- Ray, D. K., West, P. C., Clark, M., Gerber, J. S., Prishchepov, A. V., & Chatterjee, S. (2019). Climate change has likely already affected global food production. *PLoS ONE*, 14(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217148>
- Rodrigues, W. P., Martins, M. Q., Fortunato, A. S., Rodrigues, A. P., Smedo, J. N., Simões-Costa, M. C., ... Ramalho, J. C. (2016). Long-term elevated air [CO<sub>2</sub>] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Global Change Biology*, 22(1), 415–431. <https://doi.org/10.1111/gcb.13088>
- Rousch, J. M., Bingham, S. E., & Sommerfeld, M. R. (2004). Protein expression during heat stress in thermo-intolerant and thermo-tolerant diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 306(2), 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.01.009>
- Smedo, J. N., Rodrigues, A. P., Lidon, F. C., Pais, I. P., Marques, I., Gouveia, D., ... Ramalho, J. C. (2021). Intrinsic non-stomatal resilience to drought of the photosynthetic apparatus in *Coffea* spp. is strengthened by elevated air [CO<sub>2</sub>]. *Tree Physiology*, 41(5), 708–727. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa158>
- Sequeira, M., Figueiredo, L., & Mira, N. (2017). *Using proteomics to understand how parasites adapt to the host environment*. (October), 1–10.

- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 217–223. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00067-4)
- Silva, E. A., DaMatta, F. M., Ducatti, C., Regazzi, A. J., & Barros, R. S. (2004). Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis of Arabica coffee trees. *Field Crops Research*, 89(2–3), 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.02.010>
- Singh, R., Singh, P., Srivastava, P., Upadhyay, S., & Raghubanshi, A. S. (2016). Human overpopulation and food security: Challenges for the agriculture sustainability. *Environmental Issues Surrounding Human Overpopulation*, (October), 12–39. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-1683-5.ch002>
- Smith, A. R., & Zhao, D. (2016). Sterility caused by floral organ degeneration and abiotic stresses in arabidopsis and cereal grains. *Frontiers in Plant Science*, 7(OCTOBER2016), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01503>
- Su, P. H., & Li, H. M. (2008). Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology*, 146(3), 1231–1241. <https://doi.org/10.1104/pp.107.114496>
- Sugihara, K., Hanagata, N., Dubinsky, Z., Baba, S., & Karube, I. (2000). Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. *Plant and Cell Physiology*, 41(11), 1279–1285. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcd061>
- Sultana, N., Islam, S., Juhasz, A., Yang, R., She, M., Alhabbar, Z., ... Ma, W. (2020). Transcriptomic Study for Identification of Major Nitrogen Stress Responsive Genes in Australian Bread Wheat Cultivars. *Frontiers in Genetics*, 11(September), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.583785>
- Sung, D. Y., Kaplan, F., & Guy, C. L. (2001). Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum*, 113(4), 443–451. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130402.x>
- Ul Haq, S., Khan, A., Ali, M., Khattak, A. M., Gai, W. X., Zhang, H. X., ... Gong, Z. H. (2019). Heat shock proteins: Dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms20215321>
- United Nations. (2015). The future of food and agriculture: Trends and challenges. Em *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Obtido de <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>
- Valliyodan, B., & Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.019>
- van Beek, C. L., Meerburg, B. G., Schils, R. L. M., Verhagen, J., & Kuikman, P. J. (2010). Feeding the world's increasing population while limiting climate change impacts: linking N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> emissions from agriculture to population growth. *Environmental Science and Policy*, 13(2), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2009.11.001>
- Vinocur, B., & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.001>
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>

- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., & Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 19–50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>
- Zhang, X., Rerksiri, W., Liu, A., Zhou, X., Xiong, H., Xiang, J., ... Xiong, X. (2013). Transcriptome profile reveals heat response mechanism at molecular and metabolic levels in rice flag leaf. *Gene*, 530(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.048>
- Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., ... Snyder, M. (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 293(5537), 2101–2105. <https://doi.org/10.1126/science.1062191>
- Zipfel, C., & Oldroyd, G. E. D. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543(7645), 328–336. <https://doi.org/10.1038/nature22009>
- Zullo, J., Pinto, H. S., Assad, E. D., & de Ávila, A. M. H. (2011). Potential for growing Arabica coffee in the extreme south of Brazil in a warmer world. *Climatic Change*, 109(3–4), 535–548. <https://doi.org/10.1007/s10584-011-0058-0>