



JOÁZ VIEIRA LOBO

**RESPOSTAS MOLECULARES FISIOLÓGICAS
DE DOIS GENÓTIPOS DE CAFEEIROS
SUBMETIDOS A DIFERENTES PERIODOS DE
RESTRIÇÃO HÍDRICA**

LAVRAS – MG

2013

JOÁZ VIEIRA LOBO

**RESPOSTAS MOLECULARES FISIOLÓGICAS DE DOIS GENÓTIPOS
DE CAFEEIROS SUBMETIDOS A DIFERENTES PERIODOS DE
RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

PhD. Antonio Chalfun Júnior

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Lobo, Joáz Vieira.

Respostas moleculares fisiológicas de dois genótipos de cafeeiro submetidos a diferentes períodos de restrição hídrica / Joáz Vieira
Lobo. – Lavras : UFLA, 2013.

67 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Antonio Chalfun Júnior.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica* L. 2. Estresse abiótico. 3. Seca. 4. Fator de transcrição. 5. qRT-PCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.52041

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente pela vida, saúde e paz, por estar sempre presente me ajudando a vencer as adversidades;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo conhecimento acumulado desde a graduação e pela possibilidade de alcançar esse título;

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento deste projeto e concessão da bolsa de Mestrado;

Ao Professor e Orientador Antonio Chalfun Júnior, pela oportunidade de realização deste trabalho no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP/UFLA), pelas discussões, conversas e também pela paciência ao longo destes anos;

Aos colegas do LFMP, pela boa convivência, em especial ao e amigo André pelo auxílio nas avaliações moleculares;

Ao Vinícius pela parceria e ajuda durante a condução do experimento.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelos conhecimentos transmitidos, que serão muito úteis em minha vida;

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação, pela amizade e auxílio ao longo destes dois anos, que contribuíram de forma significativa para minha formação;

Aos servidores e colaboradores, Joel e Odorêncio, pelo preparo e cuidado das mudas de café;

Aos meus pais, por todo apoio, amor e confiança em mim depositados em todos os momentos e principalmente pelos muitos valores que me transmitiram;

Aos meus irmãos, Alana e Jean, pelo companheirismo e amor;

A toda minha família, pelo carinho e cuidado ao longo de toda minha vida, essa conquista também é de todos vocês;

A Thaísa, pela amizade, amor e incentivo que foram importantes nos momentos de desânimo e nas dificuldades que se apresentaram;

RESUMO

O café desponta como segunda *commodity* mais comercializada no mundo tendo importante papel na economia de muitos países, incluindo o Brasil principal produtor mundial da bebida. Entretanto, tem-se enfrentado cenários de mudanças climáticas e seus efeitos restritivos sobre a continuidade da alta produção do café. Essa realidade mostra a importância de estudos que permitam o entendimento dos mecanismos de tolerância da planta ao estresse, bem como a análise de genótipos dos genótipos mais tolerantes ao estresse da seca. Dessa forma o objetivo com este estudo foi analisar as respostas fisiológicas e moleculares de dois genótipos de *Coffea arabica*, a progênie *Siriema* apontada como tolerante e a cultivar Catuaí (Amarelo IAC 74), sensível à deficiência hídrica. O experimento foi conduzido no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, MG. Os tratamentos estabelecidos foram: um grupo de mudas recebeu irrigação contínua (Controle), outro grupo foi submetido à restrição total da irrigação e outro foi reirrigado após um período determinado de estresse, neste grupo foi avaliado a capacidade de recuperação de cada genótipo. Dentro dos tratamentos as observações e coletas de folhas foram realizadas a cada três dias e o experimento montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições por período de avaliação. O tratamento controle mostrou valores constantes para as variáveis analisadas em ambos os genótipos, os dois materiais para o tratamento não irrigado mostraram significativa redução do potencial hídrico foliar, das taxas fotossintéticas e transpiratórias e da condutância estomática, após a reirrigação pode se observar recuperação parcial do estado hídrico das plantas, sendo a cultivar Catuaí mais afetada pela restrição hídrica. As análises moleculares foram direcionadas a dois períodos de restrição, sendo que estes apresentavam potenciais hídricos típicos de estresse moderado e severo, respectivamente. As análises de expressão para os genes CcRD29 e CcRd26 mostraram que esses genes são diferencialmente expressos e superiores no tratamento não irrigado, sendo suas atividades diminuídas drasticamente após o momento da reidratação. Os dois genótipos apresentaram expressão diferencial para os genes em questão, sendo que a menor expressão na progênie *Siriema* pode estar relacionada à sua maior capacidade de manutenção do seu estado hídrico quando comparado a cultivar Catuaí.

Palavras- chave: *Coffea arabica* L.. Estresse abiótico. Seca. Fator de transcrição. qRT-PCR.

ABSTRACT

Coffee stands out as the second most traded commodity in the world, having an important role in the economy of many countries, including Brazil, the world's leading producer of the drink. However, climate change scenarios and their restrictive effects on the continuity of high coffee production have been faced. This reality shows the importance of studies which allow us to understand the mechanisms of plant tolerance to stress, as well as the analysis of the most tolerant genotypes to drought stress. Thus, this study aimed at analyzing the molecular and physiological responses of two genotypes of *Coffea arabica*, the *Siriema* progeny, identified as tolerant, and Catuaí (IAC Yellow 74), sensitive to water deficit. The experiment was conducted in the Department of Plant Physiology, Department of Biology of the Universidade Federal de Lavras, MG, Brazil. The established treatments were: a group of seedlings received continuous irrigation (Control), another was submitted to total irrigation restriction, and another was reirrigated after a certain period of stress, we evaluated the recovery capacity of each genotype in this group. Within the treatments, the observations and collections of leaves were performed every three days, with an experimental setup in a completely randomized design (CRD) with four replicates per trial period. The control treatment showed constant values for the variables analyzed in both genotypes. Both materials used for the non-irrigated treatment showed a significant reduction in leaf water potential, net photosynthesis, transpiration and stomatal conductance rates. After the reirrigation we may observe a partial recovery of water status of the plants, with the Catuaí being the most affected by water restriction. The molecular analyzes were directed to two restriction periods, presenting water potential typical of moderate and severe stress, respectively. The expression analysis for the genes CcRD29 and CcRd26 showed that these genes are differentially expressed and superior in the non-irrigated treatment, with their activities dramatically decreasing after the moment of rehydration. Both genotypes presented differential expression for the genes in question, whereas lower expression in the *Siriema* progeny may be related to its greater capacity in maintaining its water status when compared to the Catuaí cultivar.

Keywords: *Coffea arabica* L., Abiotic stress, Drought, transcription factor, qRT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Potencial hídrico foliar em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e <i>Siriema</i> submetidas ao estresse hídrico	39
Figura 2	Taxa fotossintética em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e <i>Siriema</i> submetidas ao estresse hídrico	41
Figura 3	Transpiração em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e <i>Siriema</i> submetidas ao estresse hídrico	42
Figura 4	Condutância estomática em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e <i>Siriema</i> submetidas ao estresse hídrico	44
Figura 5	Taxa fotossintética em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e <i>Siriema</i> submetidas ao estresse hídrico	47
Figura 6	Transpiração de mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e <i>Siriema</i> submetidas ao estresse hídrico	48
Figura 7	Condutância estomática em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e <i>Siriema</i> submetidas ao estresse hídrico	49
Figura 8	Perfil da expressão por qRT-PCR de CcRD26, CcRD29 em folhas de café dos genótipos Catuaí e <i>Siriema</i> em dois períodos de restrição hídrica	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na qRT-PCR (CcRD26 e CcRD29).....	37
Tabela 2	Valores médios para o tratamento irrigado (n=4) dos parâmetros de potencial hídrico foliar (Ψ_{pd}) e trocas instantâneas de gás [assimilação líquida de CO ₂ (A), condutância estomática (gs), transpiração (E)]	38
Tabela 3	Valores médios para o tratamento não irrigado (n=4) dos parâmetros de potencial hídrico foliar (Ψ_{pd}) e trocas instantâneas de gás [assimilação líquida de CO ₂ (A), condutância estomática (gs), transpiração (E)]	45
Tabela 4	Valores médios para o tratamento reirrigado (n=4) dos parâmetros de potencial hídrico foliar (Ψ_{pd}) e trocas instantâneas de gás [assimilação líquida de CO ₂ (A), condutância estomática (gs), transpiração (E)]	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Aspectos da cultura	14
2.1.1	Efeitos da seca na cafeicultura	15
2.2	Materiais Genéticos	18
2.3	Variáveis Fisiológicas	20
2.4	Genes responsivos regulados pelas vias ABA/dependente e ABA independente	24
2.4.1	NACRD26 e RD29 e seu papel na defesa ao estresse hídrico	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Análise fisiológica: Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental	31
3.1.1	Variáveis determinadas	32
3.1.1.1	Potencial Hídrico	32
3.1.1.2	Trocas gasosas	32
3.1.1.3	Análises estatísticas	33
3.2	Análise molecular: Condições experimentais e coleta do material vegetal	33
3.2.1	Genes analisados	34
3.2.2	Extração de RNA e síntese de cDNA	34
3.2.3	qRT-PCR	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Análises fisiológicas	38
4.2	Análises de Expressão	50
5	CONCLUSÕES	54
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A cultura do café tem grande importância no cenário mundial, isso acontece também no Brasil onde sua comercialização tem grande relevância para a balança comercial, gerando divisas que participam desde o início da cultura para o desenvolvimento do País (COELHO et al., 2009). O café se destaca dentre os produtos agrícolas no mundo, estando atrás apenas do petróleo, como a segunda *commodity* mais comercializada. O Brasil desponta como maior produtor, com cerca de 30% da produção mundial, e segundo maior consumidor de café (DAVIS et al., 2006).

Entretanto a produção do grão varia ano a ano devido à alterações nas condições climáticas, como a ocorrência de períodos cada vez mais prolongados de seca. Além disso, estudos atuais apontam para um cenário de climas mais extremos com secas prolongadas, inundações e ondas de calor mais frequentes isso devido ao fenômeno do aquecimento global (SALATI; SANTOS; NOBRE, 2012). Dessa forma novas áreas serão necessárias ao plantio, estando estas suscetíveis à diversas restrições ambientais, tais como a falta de água disponível para a agricultura, altas temperaturas, entre outras (DAMATTA; RENA, 2001).

O déficit hídrico pode ser considerado com um dos principais fatores limitantes a produção agrícola, gerando uma grande perda no crescimento da planta (ARRUDA; GRANDE, 2003). Quando em situação de restrição hídrica, diversos mecanismos em conjunto atuaram para garantir sua sobrevivência do vegetal, ajustamentos osmóticos, por exemplo, permitem que as atividades celulares sejam mantidas por um espaço de tempo maior (KRAMER; BOYER, 1995; TURNER, 1997). Além disso, com a continuidade da seca a planta utiliza do fechamento estomático para diminuir a perda de água em relação ao carbono assimilado, dessa forma aumentando a eficiência do uso da água (KRAMER; BOYER, 1995).

As respostas da planta ao ambiente restritivo levam à diminuição na produtividade, atuando como um importante fator limitante a fotossíntese. Deve se então buscar conhecimentos de cultivares com características agronômicas desejáveis aliadas a uma alta eficiência no uso da água sendo de grande importância para regiões suscetíveis à seca.

Atualmente muito tem se elucidado sobre as modificações morfológicas e anatômicas em plantas de café, apesar disso diversos mecanismos envolvidos na tolerância diferencial entre as diversas espécies de *Coffea* ainda necessitam de mais estudos.

A grande dificuldade em se caracterizar a tolerância diferencial para condições de restrição hídrica é a necessidade de avaliar não só uma variável fisiológica, mas sim um conjunto de respostas que permitam uma visão holística do processo (NASCIMENTO et al., 2011), assim, de acordo com Nogueira et al. (2001) é imprescindível que se analisem variáveis simultâneas, tais como potencial hídrico, condutância estomática, temperatura e a transpiração foliar que conjuntamente expressão melhor o status hídrico da planta.

Associadas as mudanças fisiológicas os vegetais exibem respostas às pressões ambientais em níveis celulares e estas acontecem pela percepção nas membranas celulares por receptores específicos, estes produzem mensageiros secundários, como o cálcio, que aí se ligar em proteínas específicas irão gerar um gama de respostas intracelular levando a alteração nos níveis de expressão de determinados genes ligados às respostas aos estresses ambientais (MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

Dentre os genes os muitos genes que respondem as adversidades do ambiente um classe se diferencia por sua função de modular os níveis de expressão de outros genes, estes são conhecidos como fatores de transcrição. Estes se ligam em regiões específicas de genes de resposta e dessa forma aumentam ou reprimem a expressão destes genes quando na presença um

estresse abiótico (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997; WINICOV; BASTOLA, 1997).

Assumindo o déficit hídrico como a condição que mais limita a produção do cafeeiro, este trabalho foi dividido em dois momentos, o primeiro visou avaliar alterações nas variáveis fisiológicas em mudas de cafeeiro progênie *Siriema* (tolerante) em comparação com a cultivar Catuaí IAC 74 (sensível), condicionadas a períodos distintos de suspensão de irrigação e sua capacidade de recuperação, após 48 horas da volta da irrigação. No segundo momento se procurou analisar a expressão de genes relacionados à resposta ao estresse de seca em ambos os materiais genéticos citados acima.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos da cultura

Pertence a família Rubiaceae que compreende mais de 13.000 espécies, distribuídas em, aproximadamente, 650 gêneros (DELPRETE, 2004). No Brasil, se tem registro de 130 gêneros e 1500 espécies, despontando com uma das principais componentes da florística brasileira (SOUZA; LORENZI, 2005). Oriundo do continente africano, o cafeeiro apresenta cerca de 100 espécies identificadas (DAVIS et al., 2006). Porém somente as espécies *C. arabica* e *C. canephora* mostram importância econômica correspondendo a 62% e 38% da produção mundial, respectivamente (DAMATTA; RAMALHO, 2006).

No Brasil as mudas chegaram de forma clandestina, trazidas pelo Sargento-Mor Francisco de Mello Palheta, sob as ordens do governador do Maranhão e Grão Pará da Guiana Francesa em 1727, período já se destacava no comércio (MATIELLI; RUGGIERO, 2005). Aqui encontraram condições climáticas favoráveis e se espalhou rapidamente, com produção voltada para o mercado interno. Em pouco tempo a cultura saltava de uma posição secundária para a de produto-base da economia brasileira. Por quase um século, o café se destacou como a maior fonte de riquezas, e as divisas geradas aceleraram o desenvolvimento do País (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2012).

A busca pela região ideal para a cultura do café se estendeu por todo o país, se firmando hoje em regiões do Estado de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Espírito Santo, Bahia e Rondônia, levando riquezas para diversas regiões do País (ABIC, 2012).

2.1.1 Efeitos da seca na cafeicultura

O agronegócio do café rende divisas da ordem de 91 bilhões de dólares/ano e envolve meio bilhão de pessoas em sua cadeia produtiva. O Brasil participa com cerca 30% da produção mundial, gerando um lucro de 10 bilhões de reais (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2004). O cafeeiro é cultivado em mais de 80 países em quatro continentes, incluindo Uganda, Burundi, Ruanda e Etiópia (África) que possui o café como principal produto exportação (WILLSON, 1999).

Entretanto a continuidade desta alta produção se encontra em risco devido às mudanças nas condições ambientais, principalmente pelas mudanças nos ciclo hidrológico. A seca pode ser considerada como principal fator limitante a produção do café, prejudicando a disponibilidade de água e a absorção de nutrientes. Sua influência na sobrevivência/produktividade da planta é proporcional ao período de restrição hídrica, implicando numa menor produção líquida (DAMATTA; RAMALHO, 2006). Em regiões anteriormente produtivas onde não havia a irrigação, a produção do café apresentou uma diminuição de até 80% na safra em anos de seca prolongada. Além da seca, outras variáveis também podem atuar modificando as respostas da planta, como nível de CO₂, radiação solar, temperatura e umidade relativa do ar (GRANT, 1992).

Devido às mudanças no clima atual e ao aumento na demanda da bebida a cafeicultura tem sofrido uma expansão para áreas marginais, como o cerrado mineiro e o oeste baiano, antes consideradas regiões inaptas ao plantio. Juntamente a esse crescimento temos a distribuição irregular das chuvas ao longo do ano, aliado ao aumento da temperatura o que poderá levar a limitações na produção do café (SILVA; MAZZAFERA, 2008).

Naturalmente a condição hídrica da planta varia longo do dia, isso devido a processos como absorção de água e transpiração. Se a absorção pelas raízes é maior que a transpiração as plantas possuem balanço positivo, nos períodos em que as temperaturas se elevam essa relação se inverte tornando o balanço negativo. Para se adaptar a essas alterações e diminuir a perda excessiva de água, ocorrem mudanças como o fechamento e abertura dos estômatos. Isso é importante, pois permite a planta assimilar mais quando em condições hídricas e nutricionais ideais, e sobreviver quando se enfrenta um déficit de água. Durante seu ciclo de vida devido às limitações ambientais o vegetal desenvolve mecanismos que lhe conferem maior adaptabilidade, quando em condições de normalidade a parte aérea em desenvolvimento, por exemplo, atua como principal dreno de fotoassimilados, porém, quando submetida ao déficit hídrico moderado, as raízes passam a receber maior proporção de assimilados, buscando maior crescimento radicular conseqüentemente uma absorção de água superior (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Além desta alocação mudança na distribuição dos assimilados o metabolismo da planta passa a perder ou acumular determinados metabólitos, como carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos, além de alterar o balanço enzimático e de síntese proteica. Esses processos caracterizam o ajustamento osmótico e podem ser considerado como principal mecanismo de adaptação fisiológica da planta a fim de minimizar os efeitos do estresse hídrico (CHAVES, 1991). Os mecanismos de defesa citados acima reduzem as trocas de CO₂, bem como seu transporte para a folha, levando a queda na produção de carboidratos pela planta. Entretanto por apresentar certa plasticidade frente ao estresse se observou que essas variáveis tendem a voltar ao seu estado normal, quando ocorre à volta da irrigação, contudo dependendo da severidade do estresse não se alcança novamente a condição inicial (LOPES et al., 1988).

O cafeeiro apresenta alguns mecanismos fisiológicos de resposta quando submetidos ao estresse, estes parecem estar fortemente relacionados à grande sensibilidade estomática induzida pelo déficit hídrico no solo (CARR, 2001; PINHEIRO et al., 2005) ou na atmosfera (BARROS et al., 1997; PINHEIRO et al., 2005). Ocorre redução no fluxo de vapor e transpiração, além da queda na absorção de água e de nutrientes pelo sistema radicular após o período de estresse, levando a queda da produção (MATIELLO; DANTAS, 1987). Acarretando uma diminuição fotossintética e respiratória, assim como o crescimento do vegetal (COSTA et al., 1997).

O ajuste osmótico também é uma estratégia amplamente utilizada pelo cafeeiro para promover a manutenção do turgor celular e tem sido intensamente investigada como possível mecanismo de tolerância à seca. O acúmulo de solutos compatíveis pode contribuir na conservação do volume protoplasmático, contudo em condição de estresse a manutenção de um alto conteúdo relativo de água é mais importante para a tolerância à seca (DAMATTA et al., 1993).

As espécies de *Coffea* apresentam certas características para a manutenção do turgor celular, entretanto estas variam de acordo com a cultivar e o período de deficiência hídrica (MARTIM, 2003). A grande dificuldade é ligar essa tolerância a cultivares que possuem alta produtividade, dentre as espécies de café arábica ocorrem níveis diferenciais de ajuste a condição de seca, e isso pode estar ligado a eficiência no uso da água (DAMATTA; RAMALHO, 2006).

Além da seca, outros fatores ambientais também contribuem para as flutuações na produtividade, como altas temperaturas diurnas e irradiâncias e baixas temperaturas noturnas (DAMATTA, 2004), logo a influência da falta de água deve ser considerada em conjunto o que podendo potencializar a diminuição nas taxas fotossintéticas, mesmo que as demandas nutricionais da planta estejam disponíveis (DAMATTA; RENA, 2002). Em plantas de café estressadas pela seca sob alta irradiância, por exemplo, pode ocorrer foto

inibição da fotossíntese (MOHOTTI; LAWLOR, 2002), isto ocorre para se evitar a formação de espécies reativas que podem gerar danos foto oxidativos (PINHEIRO et al., 2004).

2.2 Materiais Genéticos

O material Siriema foi obtido pelo cruzamento entre ‘Blue Mountain’ e *C. racemosa*, retrocruzada com ‘Mundo Novo’, realizado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), após se realizou seleção em Caratinga, MG e então as linhagens foram cruzadas com Catimor. Os descendentes foram então selecionados, F2 em Varginha, MG; F3 em Coromandel, MG e F4 foram selecionadas em Varjão de Minas (MATIELLO et al., 2004).

As plantas selecionadas se mostraram com boa produtividade, semelhante a cultivar Catuaí, apresentavam folhas verdes mais escuras e limbo foliar mais espesso. Em campo também foi demonstrado que a cultivar apresentou maior resistência à seca (CHAGAS, 2008).

A comprovação da superioridade foi testada em plantas Siriema de dois anos e cinco meses de idade. Após um período de restrição hídrica e nutricional Matiello et al. (2003, 2004) conferiram notas numa escala de 1 a 5 de acordo como vigor mostrado por cada cultivar após submetida ao estresse. A cultivar Siriema apresentou um bom vigor recebendo notas 4 e 5 em 2003 e 2004, respectivamente. Outros materiais *Coffea arabica*, como Acauã, Palma I e II e HK 29/74 apresentaram notas de 1 a 3.

Estudos realizados por Carvalho et al. (2007) com progênies de Siriema mostraram que fenótipos mais precoces mostravam diferenciação floral prematura e apresentaram maior resistência à seca em relação a genótipos tardios, evidenciando essa característica como passível de seleção para genótipos mais adaptados a restrição hídrica.

A Cultivares de Catuaí foram originadas a partir do cruzamento artificial do cafeeiro

Caturra Amarelo-C476-11 com o Mundo Novo CP 374-19, tendo a seleção genética ocorrido no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em 1949, se buscava nessa associação a rusticidade e vigor do Mundo Novo e o porte abaixo e à boa capacidade produtiva da Caturra.

O resultado da hibridação foi registrado como H 2077 resultando em três plantas, e após a seleção destas se utilizou a planta de número 2 (H 2077-2), para o melhoramento dessa hibridação. Na geração F₂, foram selecionados, com base na produção e vigor vegetativo, as plantas de números 5 e 12 que receberam os prefixos (H 2077-2-5 e H 2077-2-12), respectivamente. A planta H 2077-2-5 era homocigota para o fator caturra e heterocigota para o fator xanthocarpa. O fator caturra é determinado pelo gene dominante CtCt, que determina a redução do comprimento dos internódios. O elemento Xanthocarpa é determinado pelo gene codominante Xc, sendo determinante na coloração do exocarpo do fruto, sendo esse vermelho (XcXc), Alaranjado (XcXc) ou amarelo (xcxc). As gerações dos cafeeiros de frutos com exocarpo vermelho, a partir das gerações F₄, deu-se a denominação de Catuaí Vermelho e as de frutos com exocarpo amarelo denominou-se Catuaí Amarelo (CARVALHO; MÔNACO, 1972; FAZUOLI, 1986). O processo de seleção das cultivares de Catuaí é contínuo e ocorre em diversos Estados produtores. Em Minas Gerais, cafeeiros selecionados nas diversas linhagens de Catuaí têm sido estudados pelo método genealógico. As seleções têm levado a aumento na produtividade, precocidade e uniformidade de maturação de frutos. As linhagens lançadas pelo IAC, na geração F₄, hoje já se estão nas gerações F₇ e F₈ (MELO; BARTHOLO; MENDES, 1988).

2.3 Variáveis Fisiológicas

De acordo com que apresentado acima, várias características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas possuem correlações, em maior ou menor grau, com os possíveis mecanismos determinantes da tolerância à seca em café. Notadamente, o principal componente de adaptação diferencial à seca entre os cafés do tipo arábica e robusta parece ser comportamental, relacionado às taxas de uso da água ou eficiência na extração de água do solo (DAMATTA et al., 2003; DIAS et al., 2007; MEINZER et al., 1990). Assim torna-se importante o estudo de mais de uma variável fisiológica para se entender acima de tudo a interação entre elas e suas consequências para as plantas. Neste trabalho se analisou o potencial hídrico (Ψ) a fotossíntese (A), a condutância estomática (g_s) e a taxa de transpiração foliar (E).

Modificações fisiológicas e morfológicas acontecem naturalmente, variam até mesmo de acordo com a posição da folha na planta, visto que diferentes posições recebem quantidades de luz diferenciadas (HOLLINGER, 1989; ISHIDA et al., 1999). Portanto, para se caracterizar uma espécie quanto a sua capacidade de tolerância ao estresse deve se conhecer sua eficiência de manter nos níveis fotossintéticos seja por adaptações morfológicas ou fisiológicas que permitiram melhor captação de luz, ou mesmo se adequar as disponibilidades do ambiente (PORTER, 2001). Como a maioria das plantas lenhosas cultivadas o café é comum de ambientes sombreados apresentando dessa forma pequenos valores de A (DAMATTA, 2003), ainda que sob condições ideais de cultivo (SILVA et al., 2004). Para A foram encontrados para *C. arabica* valores entre 7 a 12 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, porém, com predominância, de valores próximos de 4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (RENA et al., 1994). Esses valores baixos quando comparados com outras lenhosas podem se devido à interação entre as respostas fisiológicas com fatores abióticos como déficit hídrico,

elevada temperatura atmosférica e excesso de irradiância pode limitar a assimilação de carbono e seu crescimento quando em condições de campo (AMARAL et al., 2001). As taxas fotossintéticas oscilam consideravelmente nas diferentes folhas de uma mesma planta, onde podem ser diminuídas por limitações difusivas e bioquímicas (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997). A primeira atua na diminuição na concentração interna de CO_2 (C_i) podendo ter seu efeito diminuído pelo aumento nas concentrações de CO_2 externo. Já as limitações químicas se relacionam com a parte fotoquímica e com a atividade enzimática ligada a fase bioquímica da fotossíntese, bem como no metabolismo dos carboidratos e do nitrogênio (BOYER, 1995; FOYER et al., 1998; KANECHI et al., 1996; PAUL; DRISCOLL, 1997). As fontes de variação fotossintética citadas acima então intimamente ligadas à espécie e aos genótipos específicos de uma mesma espécie que estão mais ou menos adaptados a restrições do ambiente (GUO et al., 2002).

Considerando o interesse agrônômico no café a queda na taxa fotossintética é indesejada, pois limita a produção de biomassa levando a diminuição na produção dos grãos. Portanto, nesse contexto é importante considerar o quanto a planta consegue manter sua taxa fotossintética ao mesmo tempo em que diminui as perdas evaporativas de água. Essa relação é afetada diretamente transpiração foliar (E), que por sua vez diminui significativamente numa condição de estresse hídrico. A planta o faz primariamente por meio do fechamento parcial dos estômatos quando em condição de déficit de pressão de vapor atmosférico (VPD_{air}), acima de 1,6 kPa. Isto acontece pela característica herdada nos genótipos comerciais de café e que garante certa adaptação à condição primitiva de sombra (CARR, 2001). Entretanto essa estratégia de passa a limitar a entrada de CO_2 e por consequência as taxas fotossintéticas.

Os movimentos estomáticos permitem o controle das trocas gasosas e na saída do vapor de água e tem grande importância na resposta às modificações

ambientais incluindo as macromudanças globais (HETHERINGTON; WOODWARD, 2003). A forma como os estômatos vão atuar no controle das trocas gasosas deve ser bem estudada nas diversas espécies a fim de compreender os fenômenos físico-químicos dentro e ao redor das células guardas. Diversos trabalhos revelam que variações na intensidade de luz e na concentração de CO₂ levam a mudanças nessa dinâmica das células guardas (ASSMANN; SHIMAZAKI, 1999; SCHROEDER et al., 2001; VAVASSEUR; RAGHAVENDRA, 2005; ZEIGEIR et al., 2002). Por meio dos estômatos ocorrem às trocas gasosas responsáveis pelo aporte O₂ na atmosfera, bem com a entrada e saída do CO₂, durante os processos de fotossíntese e respiração, respectivamente. Esse processo é importante para o ciclo do carbono na atmosfera, atuando como principal fluxo de carbono entre atmosfera e planta, sendo a respiração foliar responsável pelo lançamento de 10 a 40% do CO₂ para a atmosfera nos ecossistemas terrestres (MEIR et al., 2008; WRIGHT et al., 2006).

Para se medir o sucesso com que a planta tolera o estresse é importante considerar a sua eficiência no uso da água (*WUE*), esta mostra a razão entre ganho de carbono e perda de água na transpiração, e tem grande influência na produtividade e na habilidade de tolerar um estresse (JONES, 1993; LAUTERI et al., 1997). Assim as plantas podem investir na manutenção positiva dessa razão, seja pelo aumento na assimilação de carbono *A* ou pela diminuição na perda pela *E*.

Mais uma vez é necessário o entendimento conjunto das respostas da planta as influências ambientais por isso a análise da *g_s* tem concentrado muitas das pesquisas fisiológicas em plantas a um longo tempo, devido à correlação entre *g_s* e aquisição de carbono pelos vegetais e, assim ao crescimento da planta (ADDINGTON et al., 2004). Dessa forma o CO₂ que será assimilado e

disponibilizado a planta ocorre na mesma via onde haverá a perda de água no momento da transpiração estomática (MACHADO; LAGÔA, 1994).

Os fenômenos de fotossíntese e transpiração estão amplamente relacionados aos estômatos, pois estes desempenham papel tanto no bloqueio da perda de água da folha para atmosfera, quanto para a assimilação de CO₂. Dessa forma a redução na condutância estomática leva a diminuição da quantidade de água perdida pela planta, reduzindo por consequência as taxas fotossintéticas (PEARCY; PFTISCH, 1991).

A condutância estomática vai atuar também sobre a temperatura da folha e dessa forma sobre a absorção de CO₂ na planta (LARCHER, 2006). Essa variável atua notadamente sobre os processos bioquímicos e fotoquímicos de fixação de CO₂ (PASTENES; HORTON, 1996). Em resumo, a temperatura altera a assimilação de carbono na folha modificando assim a velocidade das reações do ciclo de Calvin (SALVUCCI; CRAFTS-BRANDNER, 2004), bem como o transporte de elétrons na cadeia respiratória (SALVUCCI; CRAFTS-BRANDNER, 2004; WISE et al., 2004).

A diferença de pressão de vapor entre a folha e o ar leva ao movimento estomático e depende diretamente da taxa de transpiração total da folha e do gradiente de potencial hídrico entre as células guardas e outras células epidérmicas (YONG; WONG; FARQUHAR, 1997). Diversos trabalhos relatam as variáveis que influenciam no fechamento dos estômatos, Pitman (1996) demonstrou que o potencial hídrico do solo, e a temperatura são importantes condições ambientais que afetam significativamente essa abertura estomática. Para Tribuzy (2005), o aumento na *Tfoliar* acarreta uma diminuição na condutância estomática estando esta limitação fortemente associada à redução da fotossíntese.

2.4 Genes responsivos regulados pelas vias ABA/dependente e ABA independente

Apesar da grande importância que se tem dado aos estudos envolvendo a genômica para o melhor entendimento da tolerância à seca em café ainda pouco se sabe, novas áreas estão sendo abertas pela biologia molecular e deve acrescentar muito para a melhor compreensão dos mecanismos de tolerância em *Coffea*, o que deverá ser potencializado pelo projeto EST-Genoma Café (VIEIRA et al., 2006), que produziu cerca de 130.000 etiquetas de sequências expressas. Este conhecimento está possibilitando a descoberta de diversos genes ligados aos vários estresses ambientais, esses novos conhecimentos gerados por meio das ferramentas moleculares poderão contribuir significativamente para com os programas de melhoramento do café, principalmente devido a este cenário de expansão da cafeicultura brasileira para áreas de menor disponibilidade hídrica. Dessa forma é importante caracterizar dois conjuntos de genes que atuam no sentido de promover a resposta da planta ao estresse da seca, os que são ou não responsivos ao fitormônio ácido abscísico (ABA) que aparece em diversas espécies de vegetais e tem papel fundamental na regulação de diversos processos metabólicos inclusive nas respostas a estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Suas funções como fitormônio do estresse estão ligadas às respostas às condições adversas (déficit hídrico, alta salinidade, vernalização e choque térmico), e pode atuar como modulador da expressão gênica durante o processo de tolerância. Diversos genes respondem a condições externas desfavoráveis, e estes se dividem em dois grupos, os genes expressos apenas na presença de ABA e outro que possui expressão independente mesmo quando se faz aplicação de ABA exógena.

O esclarecimento das rotas metabólicas e vias de sinalização do ABA foi possível com a utilização de plantas-modelo mutantes, com isso pode se observar variações nas respostas ao estresse, por meio de análises genômicas e dos seus produtos em diferentes constituições genéticas, quando submetidos aos diferentes níveis de estresse. Foi possível a identificação de regiões/estruturas que possuem papel na regulação responsiva as condições desfavoráveis. Diversos genes relacionados ao estresse abiótico são controlados pelo ácido abscísico, entretanto outros apresentam diferentes mecanismos de controle (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Esse modelo de estudo permitiu que diversos genes responsivos ao estresse como estresse hídrico e por frio, tivessem suas regiões promotoras conhecidas, bem como a informação sobre alguns elementos reguladores (intitulados cis-elementos ou cis-atuantes). Estes estão presentes na região promotora do gene e podem sofrer a ação de certas proteínas, conhecidas como fatores de transcrição.

Os fatores de transcrição atuam sobre elementos específicos na região promotora e são fundamentais para que ocorra a transcrição do gene. Atualmente se sabe que podem ocorrer sistemas ABA-dependentes e ABA-independentes, sendo estes induzidos por diversos fatores externos e ainda pode se verificar a existência de interligação (*cross-talk*) entre estes sistemas de resposta (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Os vegetais como organismos sésseis estão à mercê das diversas limitações ambientais, por isso desenvolveram mecanismos para minimizar seus efeitos e garantir assim sua sobrevivência o déficit hídrico, por exemplo, pode limitar drasticamente seu crescimento, dessa forma diversas estruturas atuam para manter o turgor do meio intracelular e a manutenção da maquinaria celular (MAESTRI et al., 1995). Nessa condição de seca se destaca o aumento na

síntese do ácido abscísico (ABA) nas raízes, que é então translocado para porção aérea da planta, por meio do xilema (HARTUNG et al., 2002).

Diversos estudos foram feitos para esclarecer os meios de atuação dos genes ABA-dependentes, nestes genes foram encontradas regiões conservadas em suas regiões promotoras. Os primeiros a serem identificados foram o gene *Em*, identificado em trigo é expresso no processo final de maturação das sementes e o gene *RAB16*, identificado em arroz é expresso durante os processos finais de maturação das sementes e nos tecidos vegetativos secos. Posteriormente, foram encontrados em *Arabidopsis* e então denominados ABRE (*ABA-Responsive Element*) (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1997). Esta região comum nestes genes atua como *cis*-elemento e está presente na região promotora de vários genes ABA responsivos, apresentando nesta região um núcleo central ACGT, denominado *G-box* (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). Para alguns genes o elemento ABRE não é capaz de ligar a transcrição individualmente, por este motivo aparece um segundo elemento *cis*-atuante denominado CE (*Coupling Element*) estes juntamente com elemento ABRE ativam a transcrição em resposta ao ABA (SHEN; HO, 1995).

A estes elementos presentes nas regiões promotoras vão se ligar proteínas específicas, que vão coordenar a expressão gênica. Um grupo destas proteínas foi denominado zíper de leucina (*bZIP-Leucine zipper motif*) e estas se ligam aos elementos do tipo ABRE. Novamente as plantas modelos são utilizadas com o propósito de caracterizar tais proteínas, em estudos com *Arabidopsis* foram encontradas três proteínas que se ligam aos elementos responsivos ao ABA, sendo denominadas AREB1, AREB2 e AREB3 (*ABA-Responsive Element Binding Protein*) apresentando estas homologia ao domínio bZIP (UNO et al., 2000). Estes fatores possuem grande participação como ativadores gênicos ABA-responsivos, no entanto, outros fatores de transcrição

podem também atuar nessa via de resposta como MYB e MYC, contudo se ligam a diferentes *cis*-elementos no promotor. Alguns estudos evidenciaram que a aplicação exógena da ABA pode aumentar ação de outros elementos.

O gene RD22 (*dehydration-responsive*), isolado em *Arabidopsis*, é ativado quando em restrição hídrica e também pela aplicação exógena de ABA, sua região promotora apresenta uma região -67pb onde se ligam dos fatores de transcrição MYC e MYB (ABE et al., 2003). MYC (*Myelocytomatosis Oncogene*) e MYB (*Myeloblastosis Oncogene*) são proteínas que se apresenta estrutura tridimensional na forma de hélice-volta-hélice (*helix-turn-helix*) foram descritas em animais desempenhando papel no processo de proliferação celular. Nos vegetais, tais proteínas atuam no metabolismo secundário, nas respostas a hormônios e regulação de morfogênese celular (BUCK; ATCHLEY, 2003).

As vias de respostas ABA-independentes também são muito estudadas, pois possuem diversos genes chaves nas respostas aos estresses abióticos. Entre estes podemos destacar os genes que na sua região promotora apresentam *cis*-elementos conservados do tipo DRE, CTR, LTRE (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Muitos trabalhos têm apontado os genes RD29A, COR78 e LTI78, como induzidos pelo déficit de água, pelo frio e por ABA, respectivamente. Estes apresentam uma região conservada de 9pb, denominada DRE (*Drought Responsive*), para o gene RD29A este elemento atua de maneira ABA-independente quando submetidos aos estresses de desidratação e frio (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1994).

Em trabalhos posteriores com *Arabidopsis* sob estresse, foram encontradas três sequências que codificam fatores de transcrição classificados como CBF1 (*C-Repeat Binding Factor*), DREB1A e DREB2A (*Dehydration Responsive Element Binding Factor*), os quais se ligam aos *cis*-elementos DRE/CRT (LEE; HENDERSON; ZHU, 2005). Outro grupo de genes que

respondem ao estresse independentemente da presença do ABA são conhecidos como ERD1 (*Early Responsive Dehydration 1*), com homologia a proteína CLP (*Caseinolytic Protease*) (SIMPSON et al., 2003). Este gene é induzido pela desidratação, mas também pela senescência quando em baixa luminosidade (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Apesar da diferenciação entre as rotas ABA-dependente e ABA-independente durante o processo de resposta da planta a um ambiente desfavorável, estas atuam em conjunto para garantir sua sobrevivência, além disso, diversos fatores bióticos e abióticos podem atuar ao mesmo tempo. Dessa forma se observa na planta a chamada comunicação–cruzada (*cross-talk*) isso, pois alguns genes são regulados por diferentes rotas de transdução de sinais, sinalizados em resposta a mais de um tipo de estresse. Essa nomenclatura é dada quando a sinalização para modulação de diferentes genes e rotas metabólicas associa um ou mais componentes mediadores, ou quando há produção em comum (CHINNUSAMY et al., 2003).

2.4.1 NACRD26 e RD29 e seu papel na defesa ao estresse hídrico

Os fatores de transcrição são proteínas que atuam em sítios específicos e estimulam a transcrição, age no auxílio a RNA polimerase II no início da transcrição. Sua atuação pode ser por meio da ligação em regiões melhorando a eficiência do processo ou se ligando a elementos *cis-acting* no promotor e em conjunto com a RNA polimerase formar um complexo, anteriormente ao início da transcrição (KLUG et al., 2010).

Os fatores de transcrição podem atuar de modo tecido-específico, regulando seus genes alvos, bem como podem se expressar nas células em resposta influências externas. Estes elementos podem atuar diretamente, quando se ligam na sequencia alvo gerando o efeito correspondente ou indiretamente

quando se ligam a sequências externas e posteriormente atuaram no processo de transcrição, porém requer um tipo de mudança conformacional para se tornar ativo (por exemplo, a fosforização) (KLUG et al., 2010).

Para desempenhar sua função os fatores de transcrição possuem dois domínios funcionais, o domínio de ligação ao DNA, que se liga a regiões do DNA no sítio regulador *cis-acting* e outro que se liga em regiões nos sítios *trans-acting* podendo ativar ou reprimir a transcrição por meio da ligação proteína-proteína. Esses domínios de ligação ao DNA em eucariotos possuem diversos motivos característicos em suas estruturas tridimensionais, por exemplo, hélice-volta-hélice, *zinc finger*, zíper de leucina básico (KLUG et al., 2010).

O gene RD26 está associado à produção destes fatores de transcrição do tipo NAC. Estes fatores de transcrição conhecidos como NAC (NAM- ATAF/2-CUC2) têm sido associados à resposta da planta ao estresse abiótico em plantas. Sua denominação se origina dos três primeiros domínios proteicos de ligação ao DNA, NAM (meristema apical), ATAF 1-2 (fatores ativadores de *Arabidopsis*) e CUC2 (proteína do cotilédono, estão envolvidas no desenvolvimento apical) (KUSANO et al., 2005).

Estes fatores de transcrição têm sua presença relatada em inúmeras espécies tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas, como arroz, amendoim, soja entre outras (LIU et al., 2011; PURANIK et al., 2011). Diversos trabalhos têm mostrado a ligação destes com as repostas hormonais da planta quando em condição de estresse biótico e abiótico, garantindo a elas certa tolerância. Além disso, podem estar associados com a senescência, formação das paredes secundárias e aos estresses ambientais (CHRISTIANSON et al., 2010; KJAERGAARD et al., 2011; NAKASHIMA et al., 2012; YANG et al., 2011; ZHONG et al., 2010). O gene RD29 (*responsive to desiccation*) foi dividido funcionalmente em dois grupos RD29A e RD29B, estes estão relacionados à resposta ao estresse de por seca, frio e alta salinidade. Na planta estes genes são

importantes, pois codificam para proteínas hidrofílicas, ajudando assim as plantas a suportar as condições ambientais desfavoráveis (JIA et al., 2012). Estes genes se destacam na resposta ao estresse, pois apresentam em sua região promotora dois elementos *cis-acting* um conhecido como ABRE (ABA-responsive element) e DRE (dehydration-responsive element). Dessa forma permite a ação de fatores de transcrição das vias de transdução ABA-dependente e ABA-independente (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1994). Essas são vias distintas de sinalização, porém a proteína formada pela expressão destes genes tem alta similaridade e possuem caráter altamente hidrofílico, apresentando cada uma delas um resíduo de cisteína, mostrando assim similaridade estrutural com as proteínas LEA (late embryogenesis abundant) (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise fisiológica: Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

O trabalho foi realizado em casa de vegetação no período de 14 de novembro a 1 de dezembro de 2012, no Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, onde se utilizou mudas da progênie *Siriema* e da cultivar Catuaí, na idade de seis meses, pois estas possuíam de 4 a 6 pares de folhas totalmente expandidas. As mudas foram provenientes da Fundação Procafé em Varginha, MG.

As mudas foram acondicionadas em sacos plásticos de 3 L, contendo uma mistura de solo, areia e esterco (3:1: 1, V/V/V), suplementados com 5 Kg de superfosfato simples e 1 Kg de cloreto de potássio a cada metro cúbico de substrato, de acordo com Cardoso, Alvarenga e Carvalho (1992).

Após 1 mês de aclimatação, as mudas foram irrigadas a capacidade de campo. Essa foi determinada pela irrigação constante do solo até a saturação e após o período de drenagem da água pelos poros dos sacos plásticos o conteúdo hídrico retido no solo foi pesado e caracterizado como a quantidade máxima de água que o solo consegue reter.

O experimento foi constituído de 4 plantas/período/tratamento (para cada genótipo). O total de mudas foi separado em três tratamentos: o primeiro, tratamento controle, recebeu irrigação constante (irrigado - I), essa foi feita de acordo com a quantidade de água perdida, verificada por meio da pesagem a cada período de observação. O segundo grupo teve a rega suspensa (não irrigado - NI) durante todo o experimento, já o terceiro grupo foi colocado para se medir o potencial de recuperação das plantas sob-restrição hídrica após a volta da irrigação (reirrigado - RI), para isso a cada período de coleta de dados às mudas

foram pesadas e massa de água perdida pelo solo recolocada por meio da irrigação. Cada tratamento foi avaliado a cada três dias até atingirem o potencial hídrico de murcha permanente (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Folhas frescas (totalmente expandidas correspondentes ao terceiro par de ramos plagiotrópicos) foram usadas durante as análises fisiológicas e, posteriormente nos estudos moleculares. Essas foram coletadas sempre no mesmo horário durante o dia (~ 9 h), e colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C.

3.1.1 Variáveis determinadas

Para determinar o status hídrico da planta e sua resposta ao déficit hídrico se procedeu a análise do potencial hídrico em conjunto com os dados das trocas gasosas.

3.1.1.1 Potencial Hídrico

O potencial hídrico de antemanhã foi medido no terceiro ou quarto par de folhas totalmente expandido a partir do ápice do ramo plagiotrópico com auxílio da câmara de pressão tipo Scholander (Soil moisture – Mod. 3005), no período entre as 5 e às 6 horas.

3.1.1.2 Trocas gasosas

Foram analisadas as variáveis de trocas gasosas instantâneas, dessa forma se mediu a condutância estomática (g_s), taxa de assimilação líquida de carbono (A), taxa de transpiração (E), por meio de um analisador portátil de gás infravermelho (LI-6400, Licor, Nebraska, EUA), entre 09:00 e 10:00 h. Foi

aplicada saturação artificial de fluxo de fótons ($1000 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), a uma concentração ambiente de CO_2 . Durante as medições, os valores médios de temperatura do ar dentro da casa de vegetação e temperatura da folha foram respectivamente, $34,8 \text{ }^\circ\text{C}$, e $28,8 \text{ }^\circ\text{C}$, já a média de densidade de fótons fotossinteticamente ativos foi de $717 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.1.1.3 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos (Irrigado- I, Não Irrigado - RI e Reirrigado - RI), e quatro repetições, para cada genótipo utilizado. A unidade experimental foi composta por uma planta por saco plástico. Os dados resultantes das observações foram utilizados na análise de variância. Foram feitos os gráficos dessas análises ao longo do período de restrição hídrica e se destacou às médias com diferenças significativas (ANOVA, $P \leq 0,05$)

3.2 Análise molecular: Condições experimentais e coleta do material vegetal

As análises moleculares foram feitas a partir do material vegetal coletado durante o experimento de restrição hídrica. Para isso se escolheu dois períodos, aos 9 dias onde se obteve um potencial hídrico de $-1,6 \text{ MPa} \pm 0,4$, caracterizando um estresse moderado e as 12 dias quando o potencial hídrico estava em $-3,5 \text{ MPa} \pm 0,5$, mostrando um valor de estresse severo para as mudas de café. As amostras de folhas foram coletadas e imediatamente congeladas em N_2 líquido e armazenadas em freezer, a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por período de avaliação. Cada repetição representou uma planta.

3.2.1 Genes analisados

Os genes analisados foram escolhidos por seu potencial responsivo ao déficit hídrico. Para isso foram escolhidos dois possíveis genes candidatos de acordo com trabalho realizado anteriormente por Marraccini et al. (2012), estes atuam durante a restrição hídrica, o gene CcNAC-RD26 está ligado a linha de transdução de sinal ABA-independente e tem se demonstrado sua influência na expressão de outro gene estresse responsivo o CcRD29. Dessa forma a expressão desse gene (RD29) também foi alvo de estudo deste trabalho. O gene RD29 tem sido relatado atuando na defesa ao estresse hídrico codificando as proteínas hidrofílicas do tipo LEA (*late embryogenesis abundant*) que atuam no sequestro de íons, proteção das membranas e natação das proteínas (chaperonas) e na retenção de água (BRAY, 1993; DURE, 1993; ZHU; HASEGAWA; BRESSAN, 1997).

3.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total do tecido foliar das mudas foi extraído utilizando-se o método do reagente CONCERT® (Invitrogen). 1g de tecido de cada amostra foi macerado em N₂ líquido até a obtenção de um pó fino. A cada microtubo contendo o tecido pulverizado foi adicionados 0,5 mL de tampão de extração (reagente CONCERT), homogeneizando a solução por agitação. A mistura permaneceu em temperatura ambiente por 10 minutos. Fez se centrifugação a (10.000 g), a 4 °C por dez minutos. A fase líquida foi coletada e transferida para um novo tubo, adicionando 100 µL de NaCl 5 M e 300 µL de clorofórmio, homogeneizando novamente a solução por agitação. O material foi novamente centrifugado por 10 minutos à máxima velocidade a 4 °C. A fase superior

coletada e transferida para um novo tubo adicionando o mesmo volume de isopropanol. O material permaneceu por 30 minutos à temperatura ambiente para promover a precipitação dos ácidos nucleicos. Posteriormente nova centrifugação a 4 °C, a 10.000 g por 25 minutos. O líquido do tubo foi descartado e então se adicionado 600 µL de etanol 75% ao precipitado e centrifugado por 5 minutos a 4 °C a 10.000 g. O etanol foi descartado tomando-se cuidado com o precipitado, deixado em banho seco a 37 °C até secar. O material foi eluído em 20 µL água miliQ autoclavada.

A integridade do RNA extraído foi visualizada em gel de agarose 1,2%, corado com GelRed, *Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UVITEC FireReader XS D-77Ls-20.M. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (*GE Healthcare NanoVue Plus*) para detecção de concentração e qualidade.

As amostras foram tratadas *DNase DNafree* (Ambion), em uma reação contendo 0,1 volume do tampão DNase turbo 10 X, 1 µL da enzima DNase turbo e água livre de DNase/RNase para completar o volume de 25 µL. Essa reação foi incubada a 37 °C por 30 min. Foi então adicionado 0,1 volume do reagente de inativação da DNase e as amostras foram deixadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 1,5 min a 10.000 g, e o sobrenadante transferido para novos tubos. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*). Primeiramente, o RNA foi diluído a uma concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi feito um *mix* contendo 2 µL do tampão 10X da enzima, 2 µL do *primer* RT *Random Primers* 10X, 0,8 µL do *mix* dNTP (100 mM), 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, e água para totalizando 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse

mix. Os tubos foram levados ao termociclador *Multigene Gradient* Labnet, programado com três etapas: 10 min a 25 °C para o anelamento dos *primers*; 2 h a 37 °C para ação da enzima e 5 min a 85 °C para inativá-la. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -20 °C.

3.2.3 qRT-PCR

Para os genes CcRD26 e CcRD29 foram utilizados *primers* cordialmente cedidos pelo pesquisador Alan Carvalho Andrade (CENARGEN), estes tiveram sua sequência obtida a partir de análises *in silico* em banco de dados públicos com utilização da ferramenta BLAST, essas sequências foram então comparadas contra um banco de EST de café. Os *primers* foram então desenhados utilizando o software Primer Express (Applied Biosystems). As sequências dos *primers* são mostradas na Tabela 1.

Para a análise da expressão gênica quantitativa por qRT-PCR foi utilizado o modelo Rotor Gene *Q Pure Detection* (Qiagen), utilizando o sistema de detecção SYBR Green e o cDNA obtido a partir de RNA extraído das folhas. Para reação foram utilizadas as seguintes condições: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, e finalizando com 15 segundos a 95 °C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *Rotor-Gene Q Series Software* (Versão 2.0.2). Para cada reação, foi utilizado 1,5 µL de cDNA, 0,6 µL de cada *primer* e 7,5 µL de

Master Mix SYBR green UDG com ROX (Invitrogen) para um volume final 15,0 µL/amostra. Controle negativo e curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises. A análise quantitativa dos genes de interesse foi conduzida a partir de cDNAs das folhas mudas de café, com três repetições biológicas (cada planta representa uma repetição), com três replicatas técnicas para cada uma, sendo os resultados normalizados usando CTs (Ciclo *Threshold*) obtidos pela

expressão dos gene de referência *glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH)* (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009).

O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada na reação ultrapassa a linha de base (*threshold*). O método utilizado usado foi o do CT comparativo. Para validação do experimento fez-se eficiências de amplificação dos genes alvo e de referência, dessa forma foram feitas curvas padrões para os genes em estudo nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Este procedimento também permitiu a definição da concentração de cDNA utilizada em cada reação, a qual foi de 10 ng/μL.

A concentração de cada *primer* utilizado foi de 1,5 μM.

Para normalização utilizou-se a equação $\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra}) - \Delta CT (\text{calibrador})$. Para calibrador uma amostra usada foi utilizada como base para resultados de expressão comparativa, sendo que neste estudo foi utilizada a amostra 12RI (12 dias reirrigado) Siriema como calibradora para os CcRD29 e CcRD26. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 1 *Primers* utilizados na qRT-PCR (CcRD26 e CcRD29)

Gene	Sequência do <i>primer</i>
CcRD26 F	5'-TTTGGCCCTGCGCTCTAGT-3'
CcRD26 R	5'-AAGCGGGTCAGTTTCTCGAA-3'
CcRD29 F	5'-TGATGATCAAGATCCCCAACAC-3'
CcRD29 R	5'-CTTCGCTTTCGCCTTCACTT-3'
GAPDH F	5'TTGAAGGGCGGTGCAA 3'
GAPDH R	5'AACATGGGTGCATCCTTGCT 3'

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises fisiológicas

Para o tratamento controle, as variáveis testadas se mantiveram constantes, ao longo das avaliações, não havendo diferença significativa quanto ao status hídrico. Entretanto nas avaliações feitas aos 6 dias pode se observar um padrão diferente nos dados, isso devido à falha na aclimatização da casa de vegetação que ocorreu neste dia, e elevou a temperatura penalizando as plantas do experimento (Tabela 2). Este desvio dos dados no sexto dia também foi observado para os tratamentos não irrigado e reirrigado.

Tabela 2 Valores médios para o tratamento irrigado (n=4) dos parâmetros de potencial hídrico foliar (Ψ_{pd}) e trocas instantâneas de gás [assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (gs), transpiração (E)]

Períodos	Ψ_{pd} (MPa)	A $\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	E $\text{mmol H}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$	gs $\text{mmol H}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$
0C	-0,48	6,99*	2,32	0,130*
0S	- 0,37	5,56	2,38	0,064
3C	-0,36	6,38	2,05*	0,099
3S	-0,30	6,35	2,29	0,099
6C	-0,40	5,75*	1,85	0,015*
6S	-0,31	8,23	1,92	0,032
9C	-0,41	5,63*	2,07*	0,066*
9S	-0,38	7,05	2,34	0,106
12C	-0,26	5,55*	2,02	0,068*
12S	-0,26	7,29	2,15	0,090

Nota: Para material Siriema (S) e Catuaí (C). Médias assinaladas com asterisco indicam diferença significativa entre Siriema e Catuaí dentro de um mesmo período de avaliação. (ANOVA, $P \leq 0,05$).

Pode se observar para o tratamento irrigado maiores taxas fotossintéticas para a cultivar Catuaí até o sexto dia do experimento, após esse dia o rápido aumento da temperatura causa redução gradativa nestes valores, isso pois de acordo com Grisi (2008) em condições irrigadas o Catuaí apresenta maior densidade estomática quando comparado a Siriema, dessa forma como o aumento da temperatura no sexto dia levou a uma maior redução na condutância levando dessa forma a diminuição do CO₂ assimilado. Esse comportamento nos permite considerar a cultivar Catuaí com uma maior eficiência do uso da água para as condições iniciais de temperatura, em torno dos 24 °C. No entanto essa vantagem deixa de acontecer logo após o aumento da temperatura evidenciando a maior capacidade de tolerar as mudanças ambientais de a cultivar *Siriema*.

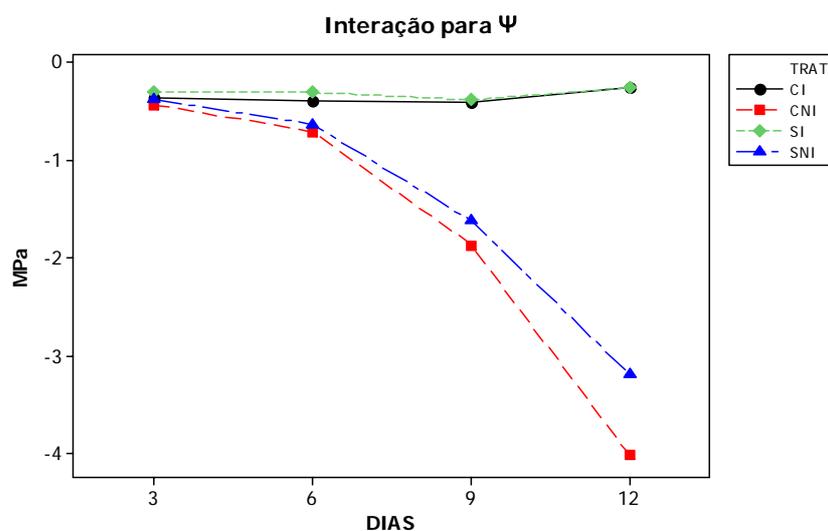


Figura 1 Potencial hídrico foliar em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e Siriema submetidas ao estresse hídrico

Nota: Para os tratamentos Irrigado (I) e Não irrigado (RI). Os pontos representam as médias de quatro repetições.

O potencial hídrico para as mudas permaneceu constante ao longo do experimento em valores próximos a $-0,4$ MPa. Porém para as mudas do tratamento não irrigado verificou-se redução gradativa a partir do sexto dia de restrição hídrica, a $-3,3$ MPa em *Siriema* e $-4,02$ MPa em *Catuaí*, aos 12 dias de experimento (Figura 1). Entretanto somente na última avaliação foi encontrada diferença significativa entre os genótipos, sendo que a progênie *Siriema* foi superior a cultivar *Catuaí*. Após este último período apenas a progênie *Siriema* apresentava folhas em condições fisiológicas para a continuidade do experimento, sendo assim foi possível confirmar a superioridade de *Siriema* quanto à tolerância ao déficit hídrico, corroborando com dados obtidos por Grisi (2008).

Este comportamento dos dados é importante, pois caracteriza o fluxo de água no sistema solo-planta-atmosfera e tem sido muito utilizado para estudos relacionados com as relações hídricas das plantas (WESTATE, 1994), caracterizando o estado fisiológico segundo o nível de estresse hídrico imposto a planta.

A taxa de assimilação de carbono encontrada para as cultivares no tratamento irrigado mostrou valores dentro do padrão esperado para o cafeeiro (Figura 2), porém houve diferença entre os genótipos, após o sexto dia evidenciando que a fotossíntese apresenta grande variabilidade, dependendo além do status hídrico da posição, temperatura e radiação recebida (DAMATTA, 2003), sendo que a progênie *Siriema* para o grupo controle foi afetada positivamente pelo aumento na temperatura. Isso pode ser justificado pelo curto período de estresse por calor e pela maior capacidade de manutenção da condutância estomática em relação a cultivar *Catuaí*.

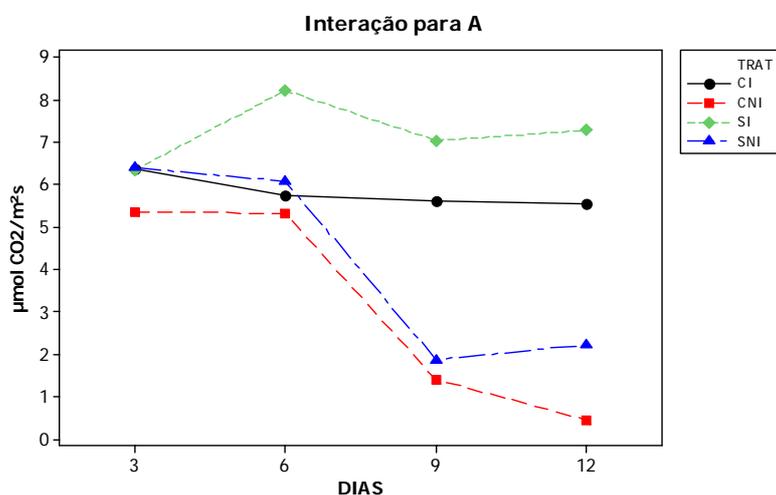


Figura 2 Taxa fotossintética em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e Siriema submetidas ao estresse hídrico

Nota: Para os tratamentos Irrigado (I) e Não irrigado (NI). Os pontos representam as médias de quatro repetições.

Para o tratamento não irrigado as plantas apresentaram acentuada queda fotossintética a partir do nono dia de avaliação, com uma redução de 75 e 73% em relação ao controle (Figura 2), para Catuaí e Siriema, respectivamente. Esse resultado fortalece a ligação entre a assimilação do carbono e a quantidade de água disponível para a planta, dessa forma os resultados encontrados neste trabalho corrobora com encontrado por Kumar e Tieszen (1980) que sugeriram para café arábica cultivado em vasos um limiar entre o potencial hídrico e redução na taxa fotossintética e associa potencial acima de -1,0 MPa a diminuição considerável na fotossíntese.

Aos 12 dias de restrição a fotossíntese ainda se mostrava ativa para *Siriema* com valores próximos a $2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, enquanto Catuaí mostrou níveis fotossintéticos próximos a zero, evidenciando a maior severidade do estresse nesta cultivar. Estes resultados estão de acordo com a resposta da planta

ao déficit hídrico, segundo Kramer e Boyer (1995) as respostas a essa restrição de passa pelo fechamento estomático, e conseqüentemente ocorre menor perda de água e diminuindo também a assimilação de carbono a ser incorporado ao metabolismo da planta. Quanto à diferença entre as cultivares (Tabela 3) é importante destacar que aos dias de avaliação a condutância estomática de *Siriema* era o dobro da *Catuai*, destacando a maior capacidade da progênie de manter o teor na água na folha quando em condições de estresse hídrico. Essa habilidade de retenção de água pode estar relacionada ao seu processo de ajustamento osmótico, como destacado por Melo (2008), quando submetida à deficiência hídrica a progênie mostrou acúmulo de açúcares solúveis totais e redutores, bem como aumento na atividade de enzimas de resposta ao estresse.

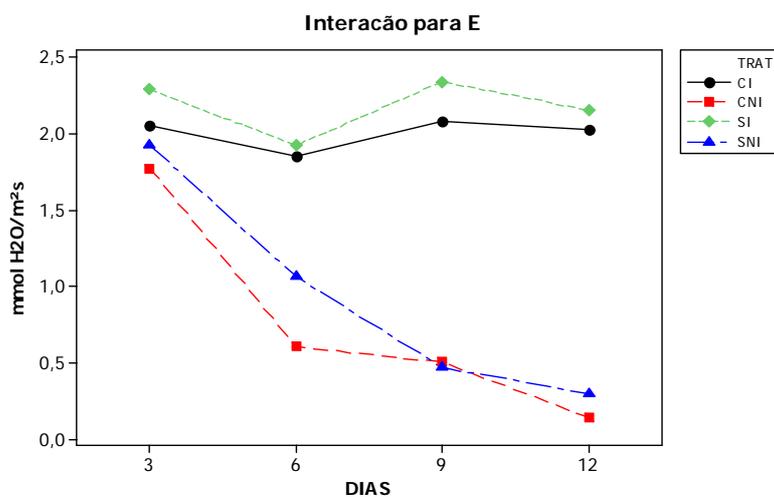


Figura 3 Transpiração em mudas de cafeeiro cultivar Catuai e Siriema submetidas ao estresse hídrico

Nota: Para os tratamentos Irrigado (I) e Não irrigado (RI). Os pontos representam as médias de quatro repetições.

O grupo controle apresentou diferença significativa entre os genótipos nos aos 3 e aos 9 dias de avaliação (Tabela 2). Sendo importante destacar a maior capacidade e rapidez com que a progênie *Siriema* se adapta as modificações ambientais, no sexto dia ela apresenta uma redução de 16% na transpiração e retorna após o estabelecimento da temperatura normal. Em *Catuaí* resposta é dada numa escala menor, 9,8% e o reestabelecimento após o estresse segue a mesma lógica.

Quando imposta à suspensão da rega pode-se observar a redução significativa nos valores de transpiração a partir do terceiro dia, com queda mais acentuada a partir do sexto dia de avaliação, aproximando ao final do experimento de valores próximos de zero (Figura 3). A transpiração pouco diferiu entre os genótipos (Tabela 3), entretanto é importante se observar a maior eficiência no uso da (*WUE*) em *Siriema*. Esta razão implica diretamente no grau de tolerância da planta em relação ao estresse e se traduz no rendimento da cultivar em condições adversas (JONES, 1993; LAUTERI et al., 1997). *Siriema* quando comparado com *Catuaí*, mostrou maior eficiência, mostrava aos 9 e 12 dias de estresse 4,02 e 7,05 mmol/mol H₂O enquanto *Catuaí* apresentava níveis médios mais baixos, 2,8 mmol /mol aos 9 dias e 3,31 mmol/mol aos 12 dias. Resposta semelhante foi obtida por Dias et al. (2007) que verificou o aumento de *WUE* em duas progênies, novamente com superioridade de *Siriema*.

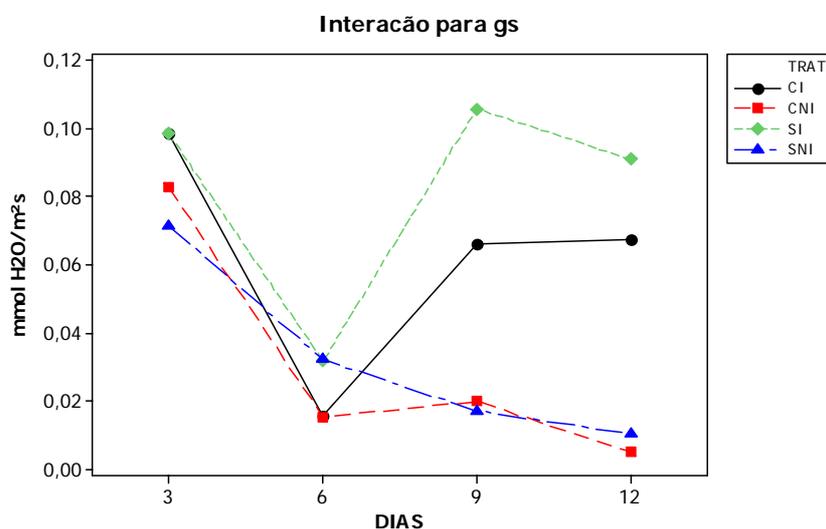


Figura 4 Condutância estomática em mudas de cafeeiro cultivar Catuai e Siriema submetidas ao estresse hídrico

Nota: Para os tratamentos Irrigado (I) e Não irrigado (RI). Os pontos representam as médias de quatro repetições.

A condutância estomática para as plantas mantidas irrigadas mostraram variação ao longo do período experimental, para ambos os genótipos, principalmente no sexto dia de avaliação (Figura 4). Para o grupo não irrigado se observou drástica redução a partir do sexto dia, chegando a valores próximos à zero aos 12 dias.

Para as plantas não irrigadas se observou redução a partir de sexto dia (Figura 4), mostrando uma diferença significativa aos 6 e 12 dias. Estes resultados novamente comprovam a superioridade do Siriema, pois nestes dois períodos quando as plantas estavam sob maior estresse, aos 6 dias quando a temperatura se elevou consideravelmente e aos 12 dias quando os potenciais hídricos já caracterizavam o estresse severo enfrentado pelas plantas. Ao analisar os dados pode-se observar que como encontrado por Dias et al. (2007),

ocorreu neste experimento forte ligação entre a queda da assimilação de carbono e a condutância estomática, e novamente caracterizou-se o material *Siriema* como mais tolerante ao estresse hídrico, por possuir maior sensibilidade estomática em relação à Catuai, quando imposta a condição de estresse.

Tabela 3 Valores médios para o tratamento não irrigado (n=4) dos parâmetros de potencial hídrico foliar (Ψ_{pd}) e trocas instantâneas de gás [assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (gs), transpiração (E)]

Períodos	Ψ_{pd} (MPa)	A $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	E $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Gs $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$
3C	-0,44	5,373	1,770	0,083
3S	-0,39	6,403	1,921	0,072
6C	-0,71	5,326*	0,601*	0,015*
6S	-0,64	6,095	1,061	0,032
9C	-1,87	1,402	0,501	0,020
9S	-1,62	1,874	0,466	0,017
12C	-4,02*	0,451*	0,136*	0,005*
12S	-3,32	2,184	0,310	0,010

Nota: Para material *Siriema* (S) e *Catuai* (C). Médias assinaladas com asterisco indicam diferença significativa entre *Siriema* e *Catuai* dentro de um mesmo período de avaliação. (ANOVA, $P \leq 0,05$).

Diversos trabalhos têm mensurado capacidade de recuperação do café após a reirrigação, Pinheiro et al. (2005) constataram em café robusta, que após a volta da irrigação ocorria rápido retorno do potencial hídrico foliar a níveis normais e este era seguido do aumento da condutância estomática, caracterizando dessa forma a o papel fundamental da água para o controle estomático. Este comportamento é importante em momentos de estresse momentâneo, por isso Melo (2008) e Wormer (1965) perceberam que com o prolongamento do estresse essa recuperação se torna mais lenta e mais distante dos valores encontrados para o grupo controle, que recebeu plena irrigação.

Tabela 4 Valores médios para o tratamento reirrigado (n=4) dos parâmetros de potencial hídrico foliar (Ψ_{pd}) e trocas instantâneas de gás [assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (gs), transpiração (E)]

Períodos	Ψ_{pd} (MPa)	A $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	E $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$	gs $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$
3C	-0,46	6,955*	1,512	0,062*
3S	-0,36	7,593	2,227	0,080
6C	-0,27	5,266	0,614	0,018
6S	-0,27	6,132	0,606	0,017
9C	-0,27	3,559*	1,005*	0,062*
9S	-0,25	6,183	1,342	0,016
12C	-0,39	1,492*	0,662*	0,052*
12S	-0,38	6,426	1,198	0,063

Nota: Para o material Siriema (S) e Catuaí (C). Médias assinaladas com asterisco indicam diferença significativa entre Siriema e Catuaí dentro de um mesmo período de avaliação. (ANOVA, $P \leq 0,05$)

Neste experimento não houve diferença entre os genótipos quanto à recuperação (Tabela 4), quando se assume que os valores encontrados não eram considerados prejudiciais as plantas, uma vez que estes foram inferiores a -1,5 MPa e parece não afetar a dinâmica da planta (DAMATTA et al., 2007; GOLBERG et al., 1988). Este comportamento pode ser devido ao curto tempo que as plantas levaram para atingir elevados valores de potencial. Melo (2008) trabalhando com o material *Siriema* mostrou que a recuperação era comprometida apenas após 27 dias de restrição, até este período havia recuperação a valores inferiores a -2,0 MPa, valor a partir do qual segundo Lima et al. (2002) a seca passa a comprometer o cafeeiro levando a diminuição na condutância estomática e assim nas taxas fotossintéticas.

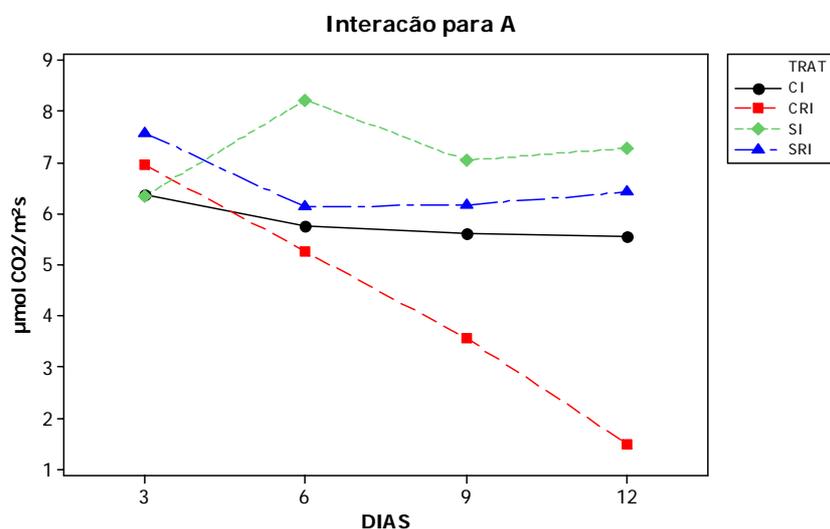


Figura 5 Taxa fotossintética em mudas de café cultivar Catuaí e Siroiema submetidas ao estresse hídrico

Nota: Para os tratamentos Irrigado (I) e Re-irrigado (RI). Os pontos representam as médias de quatro repetições.

Para o tratamento reirrigado pode se observar a recuperação dos níveis fotossintéticos para o material *Siroiema* até o último período de avaliação, enquanto Catuaí recuperou estes valores apenas até o sexto dia de avaliação (Figura 5). Foi constatado que reirrigação após 6 dias de restrição promoveu recuperação parcial, com valores médios próximos a $3,78 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e aos 12 dias não se ocorreu mais a volta aos valores normais. Entretanto, há predomínio de valores próximos a $4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (RENA et al., 1994). Assim pode se afirmar, que nas condições deste experimento apenas Catuaí não apresentou recuperação da fotossíntese a níveis considerados normais para a espécie.

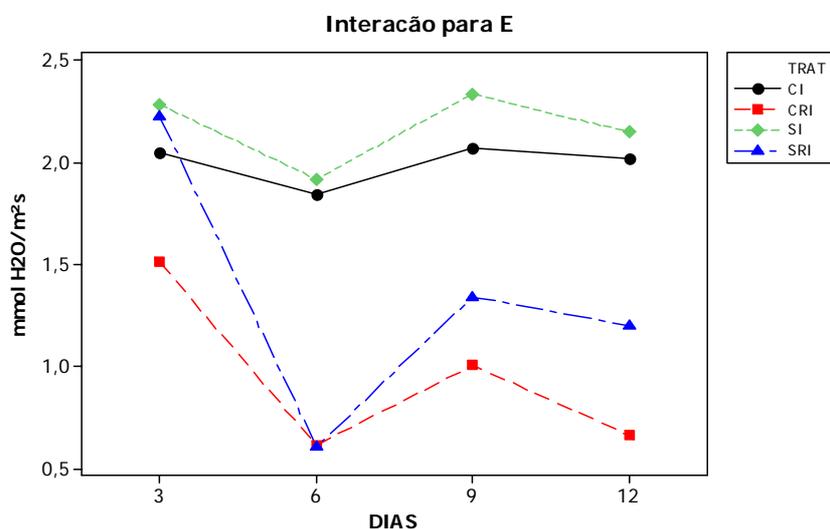


Figura 6 Transpiração de mudas de cafeeiro cultivar Catuaí e Siriema submetidas ao estresse hídrico

Nota: Para os tratamentos Irrigado (I) e Re-irrigado (RI). Os pontos representam as médias de quatro repetições.

No tratamento que visa medir a recuperação das plantas após o estresse pode se observar que as plantas não voltarão a taxas transpiratórias normais para a espécie/condição. A partir do terceiro dia não houve recuperação expressiva da transpiração para ambos os genótipos, embora pode se perceber uma recuperação mais pronunciada em *Siriema* (Figura 6). Essa característica novamente pode estar associada ao fato de *Siriema* conseguir maior teor de água na folha mesmo em condição de estresse (DIAS et al., 2007; MELO, 2008).

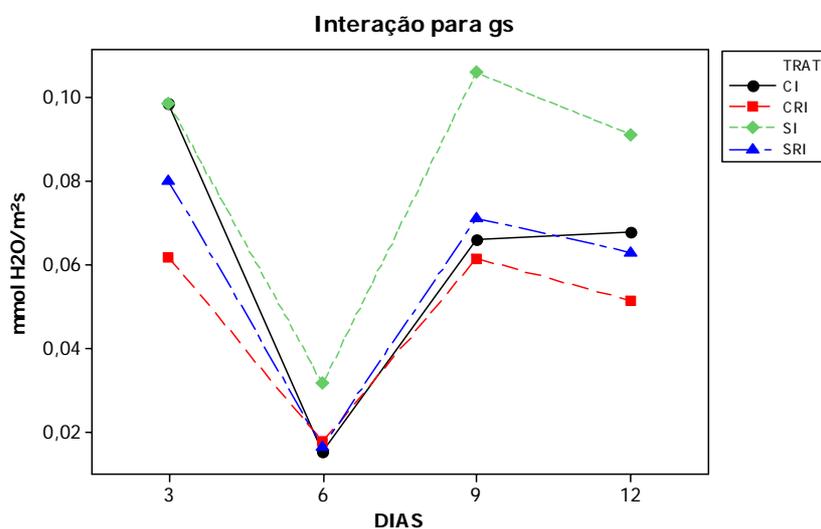


Figura 7 Condutância estomática em mudas de cafeeiro cultivar Catuai e Siriema submetidas ao estresse hídrico

Nota: Para os tratamentos Irrigado (I) e Re-irrigado (RI). Os pontos representam as médias de quatro repetições.

Assim como especulado por Damatta e Ramalho (2006) após a volta da irrigação se obsevou uma a volta da condutância a valores próximos do controle (Figura 7), mostrando a alta relação entre a sensibilidade estomática e o conteúdo hídrico dentro da planta. Os resultados evidenciaram diferença significativa entre os genótipos aos 3, 9 e 12 dias de reirrigação mostrando de forma clara a maior capacidade de *Siriema* em retornar suas características fisiológicas a níveis próximos do normal e a faz mais rapidamente quando comparado a Catuai (Tabela 4).

Este estudo foi capaz evidenciar as estratégias adotadas pelos diferentes genótipos de café para tolerar a perda de água. Estas respostas ao ambiente se fundamentam primariamente no controle estomático permitindo a diminuição na

perda de água em diferentes valores com respostas sequenciais para materiais genéticos.

4.2 Análises de Expressão

As análises foram moleculares realizadas em ambos os genótipos de *Coffea* nos períodos de 9 e 12 dias após o estresse e apresentavam potenciais hídricos próximos a $-1,6 \text{ MPa} \pm 0,4$ e $-3,5 \text{ MPa} \pm 0,5$, respectivamente. Assim, as análises dos gráficos representando os níveis de expressão relativa dos genes analisados nestes momentos permitem a observação de um comportamento similar para os genes CcRd26 e CcRD29 para os tempos escolhidos, sendo sua expressão fortemente relacionada ao status hídrico da planta (Figura 8).

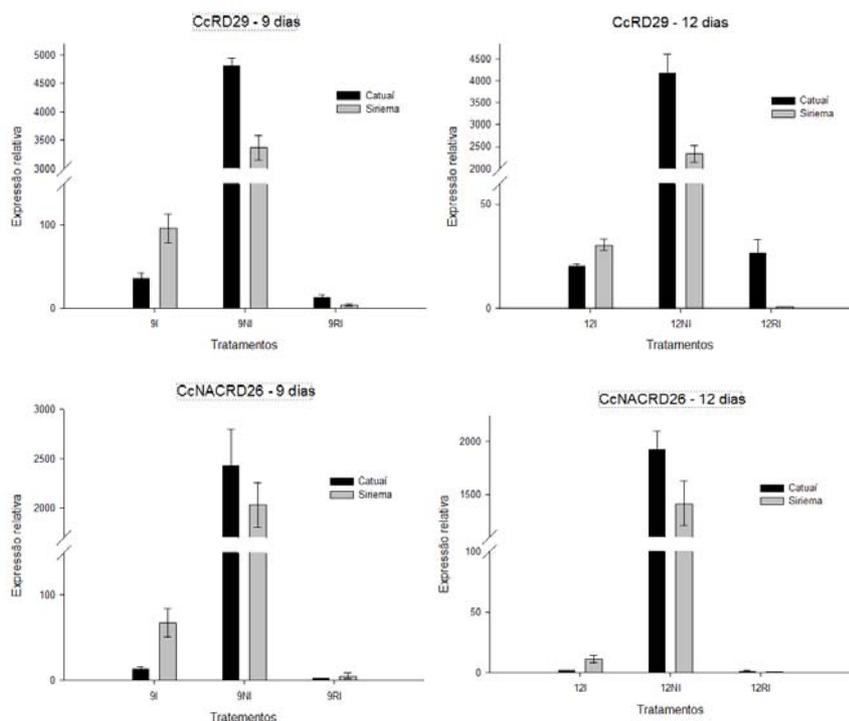


Figura 8 Perfil da expressão por qRT-PCR de CcRD26, CcRD29 em folhas de café dos genótipos Catuaí e *Siriema* em dois períodos de restrição hídrica

Nota: O eixo x representa os três tipos de irrigação e y representa a diferença de expressão relativa ao período 12RI *Siriema* para CcRD26 e CcRD29. Os valores de expressão de cada repetição biológica foram obtidos a partir da média de três replicatas técnicas e as barras de erro representam o desvio padrão de três repetições biológicas. Cada dado foi normalizado pela média dos valores de expressão do gene de referência e *GAPDH*.

Para a progênie *Siriema* pode-se observar que os níveis de expressão do gene CcRD29 aumentaram cerca de 30 vezes ao nono dia de restrição hídrica (9NI) quando comparado ao tratamento controle (9I), retornando a baixos níveis após a volta da irrigação (9RI), (Figura 8). Para os 12 dias de seca o gene se manteve mais expresso no tratamento não irrigado, tendo sua expressão aumentada em 77 vezes nas plantas sob deficiência hídrica em comparação com

as irrigadas constantemente. Assim como encontrado em trabalhos anteriores pode se observar a forte correlação entre a expressão deste gene com o status hídrico da planta (MARRACCINI et al., 2012). O gene CcRD26 também se apresentou mais expresso durante o momento de seca, sendo que sua expressão foi aproximadamente 29 vezes maior que o controle ao nono dia de avaliação, aos 12 dias de restrição apresentou uma expressão aumentada em 128 vezes. Analisando apenas o tratamento não irrigado (NI) pode se observar que entre os períodos ocorreu diminuição significativa do nível de expressão de ambos os genes, sendo que eles se apresentaram menos expressos na condição 12 dias, esse resultado demonstra que o estresse mais severo pode estar comprometendo a resposta da planta em nível molecular.

Para a cultivar Catuaí pode se observar o mesmo padrão de expressão que na progênie *Siriema*, ambos os genes tiveram sua expressão fortemente aumentada quando expostos ao estresse hídrico. O gene CcRD29 apresentou um aumento de expressão de 133 vezes quando comparado ao controle, e novamente pode se verificar que no momento da reirrigação seus níveis decresceram significativamente. Aos 12 dias foi encontrado uma elevação na expressão em cerca de 210 vezes, retornando a níveis basais após a reirrigação. Da mesma forma a expressão a gene CcRD26 foi muito maior no tratamento não irrigado tendo uma expressão aumentada na ordem de 160 vezes aos 9 dias, apresentando mesmo padrão de aumento aos 12 dias, tanto para o tratamento não irrigado como para a recuperação após a volta da irrigação.

Os padrões de expressão dos genes podem também estar associados as suas funções desempenhadas na planta o gene CcRD29 está ligado à osmoproteção da planta assim se esperava um alto funcionamento durante este trabalho, da mesma forma CcRD26 atua como um ativador e modulador da expressão do gene CcRD29, atuando como um fator de transcrição ativado pelo estresse de seca (MARRACCINI et al., 2012).

Quando observamos o comportamento de expressão entre os genótipos pode se perceber a maior atividade dos genes na cultivar Catuaí, o que não era esperado já que os genes deveriam, a princípio, ser mais expressos em Siriema, genótipo caracterizado com tolerante (DIAS et al., 2007; GRISI et al., 2008; MELO, 2008). Este resultado pode ter ocorrido pela escolha dos períodos para as análises moleculares, onde as plantas já estavam em um alto grau de estresse. Além disso, alguns trabalhos atribuem a maior tolerância de *Siriema* a sua capacidade de resposta mais rápida ao estresse (DIAS et al., 2007), mostrando grande sensibilidade na percepção e resposta ao estresse. Portanto, a expressão destes genes pode ser maior em Siriema quando se observar os momentos iniciais de estresse.

Para ambos os genes o tratamento reirrigado mostrou redução dos níveis de níveis de expressão, menores até que as plantas controle. Essa característica pode ser devia aos danos irreversíveis no nível celular. Alguns trabalhos mostram que após períodos de estresse severo ocorre a desintegração da membrana celular, isso devido ao estresse oxidativo (ALONSO et al., 2001; MORAN et al., 1994).

5 CONCLUSÕES

Os genótipos tiveram seu desenvolvimento afetado pelo déficit hídrico à medida que se aumentou o tempo de exposição ao estresse.

No conjunto das características avaliadas, a Progenie Siriema se apresentou moderadamente tolerante a seca, principalmente pela maior sensibilidade estomática e eficiência no uso da água.

As análises moleculares permitiram diferenciar os genótipos quanto no nível de expressão dos genes, sendo para os períodos estudados maior em Catuaí.

O gene CcRd26 foi para os materiais testados, menos expressos que CcRD29 isso pode ser devido a sua função de mensageiro secundário, atuando como modulador da expressão de outros genes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos adicionais são necessários para a elucidação mais completa dos mecanismos de tolerância nos materiais analisados. Para isso é importante acrescentar análises de algumas enzimas responsivas ao estresse hídrico e também ao estresse por calor sofrido aos 6 dias de experimento, podemos destacar enzimas do sistema antioxidante como HSPs (Heat Shock Proteins), desidrinas, APX (Peroxidase da Ascorbato), catalases e oxidoredutases.

Além disso, é importante acrescentar nas análises moleculares os períodos iniciais do experimento para melhor caracterizar a resposta dos genótipos ao déficit hídrico

REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 1, p. 63-78, Jan. 2003.
- ADDINGTON, R. N. et al. Stomatal sensitivity to vapor pressure deficit and its relationship to hydraulic conductance in *Pinus palustris*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 24, n. 5, p. 561-569, May 2004.
- ALONSO, R. et al. Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 9, p. 905-916, Sept. 2001.
- AMARAL, J. A. T. et al. Effects of fruiting on the growth of arabica coffee trees as related to carbohydrate and nitrogen status and to nitrate reductase activity. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 66-74, 2001.
- ARRUDA, F. B.; GRANDE, M. A. Fator de resposta da produção do cafeeiro ao déficit hídrico em Campinas. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 139-145, 2003.
- ASSMANN, S. M.; SHIMAZAKI, K. I. The multisensory guard cell: stomatal responses to blue light and abscisic acid. **Plant Physiology**, New York, v. 119, n. 3, p. 809-816, Mar. 1999.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Origem e trajetória**. Disponível em: <http://www.abic.com.br/scafe_historia.html>. Acesso em: 12 nov. 2012.
- BARROS, R. S. et al. Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potencial and stomatal conductance. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 65-72, Aug. 1997.
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.
- BOYER, J. S. Advances in drought tolerance in plants. **Advances in Agronomy**, Madison, v. 56, n. 1, p. 187-218, Jan./Feb. 1995.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, Dec. 1993.

BUCK, M. J.; ATCHLEY, W. R. Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 56, n. 6, p. 742-750, June 2003.

CARDOSO, E. L.; ALVARENGA, G.; CARVALHO, M. M. del. Efeito de doses de superfosfato simples, em substrato, sobre o desenvolvimento de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) "Mundo Novo" e "Catuaí". **Ciência e Prática**, Lavras, v. 16, n. 1, p. 35-38, 1992.

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

CARVALHO, A.; MONACO, L. C. Transferência do fator caturra para o cultivar Mundo Novo de *Coffea arabica*. **Bragantia**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 379-399, 1972.

CARVALHO, C. H. S. et al. Identificação de genótipos de café mais adaptados a ambientes com déficit hídrico durante o período outono/inverno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10., 2007, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2007. p. 62-63.

CHAGAS, I. D. **O café, suas variedades e cultivares apropriadas para nossa região**. 2008. 31 p. Monografia (Graduação em Tecnologia em Cafeicultura) - Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho, Muzambinho, 2008.

CHAVES, M. M. Effects of water déficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 234, p. 1-16, Jan. 1991.

CHINNUSAMY, V. et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 17, n. 8, p. 1043-1054, Apr. 2003.

CHRISTIANSON, J. A. et al. ATAF NAC transcription factors: regulators of plant stress signaling. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 5, n. 4, p. 428-432, Apr. 2010.

COELHO, G. et al. Efeito de épocas de irrigação e de parcelamento de adubação sobre a produtividade do cafeeiro 'Catuai'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 67-73, jan./fev. 2009.

COSTA, L. C. et al. Effects of water stress on photosynthesis, respiration and growth of Faba Bean (*Vicia faba* L.) growing under field conditions. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 5, n. 1, p. 9-16, 1997.

DAMATTA, F. M. Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: HEMANTARANJAN, E. (Ed.). **Advances in plant physiology**. Jodhpur: Scientific, 2003. p. 227-265.

_____. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 16, n. 1, p. 1-6, Jan./Apr. 2004.

DAMATTA, F. M. et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

_____. Water relations of coffee leaves (*Coffea arabica* and *C. canephora*) in response to drought. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 68, n. 5, p. 741-746, 1993.

DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 55-81, Jan./Mar. 2006.

DAMATTA, F. M.; RENA A. B. Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno sol. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 93-135.

_____. Tolerância do café à seca. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa, MG: UFV, 2001. p. 65-100.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, 2006.

DELPRETE, P. G. Rubiaceae. In: SMITH, N. et al. (Ed.). **Flowering plants of the neotropics**. Bronx: The New York Botanical Garden, 2004. p. 328-333.

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

DURE, L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 363-369, 1993.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **O agronegócio café no Brasil e no mundo**. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/biotec/genomacafe/historico.html>>. Acesso em: 5 nov. 2012.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro**. Piracicaba: PATAFOS, 1986. p. 87-113.

FOYER, C. H. et al. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 1, p. 283-292, May 1998.

GOLBERG, A. D. et al. Effects and after-effects of water stress on chlorophyll fluorescence transients in *Coffea canephora* Pierre and *Coffea arabusta* Capot and Aké Assi. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 32, n. 1, p. 11-16, 1988.

GRANT, R. F. Interaction between carbon dioxide and water deficits affecting canopy photosynthesis: simulation and testing. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 6, p. 1322-1328, Nov. 1992.

GRISI, F. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'catuaí' e 'sirriema' submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, nov./dez. 2008.

GUO, J. et al. Diurnal and seasonal photosynthesis in two asparagus cultivars with contrasting yield. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 399-405, Mar. 2002.

HARTUNG, W. et al. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 366, p. 27-32, 2002.

HETHERINGTON, A. M.; WOODWARD, F. I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. **Nature**, London, v. 424, p. 901-908, Aug. 2003.

HOLLINGER, D. Y. Canopy organization and foliage photosynthetic capacity in a broadleaved evergreen montane forest. **Functional Ecology**, Oxford, v. 3, p. 52-62, 1989.

ISHIDA, A. et al. Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in relation to leaf angle, azimuth, and canopy position in the tropical pioneer tree, *Macaranga conifera*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 19, n. 2, p. 117-124, Feb. 1999.

JIA, H. et al. Analysis and application of RD29 genes in abiotic stress response. **Acta Physiologiae Plantarum**, Pozann, v. 34, n. 4, p. 1239-1250, July 2012.

JONES, H. G. Drought tolerance and water-use efficiency. In: SMITH, J. A. C.; GRIFFITHS, H. (Ed.). **Water deficits: plant responses from cell to community**. Oxford: Bios Scientific, 1993. p. 193-201.

KANECHI, M. et al. Non-stomatal inhibition associated with inactivation of Rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 37, n. 4, p. 455-460, 1996.

KJAERGAARD, T. et al. Senescence-associated barley NAC (NAM, ATAF1, 2, CUC) transcription factor interacts with radical-induced celldeath 1 through a disordered regulatory domain. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 41, p. 35418-35429, Oct. 2011.

KLUG, W. S. et al. **Conceitos de genética**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 896 p.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of woody plants**. San Diego: Academic, 1997. 411 p.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic, 1995. 495 p.

KUMAR, D.; TIESZEN, L. L. Photosynthesis in *Coffea arabica*: I., effects of water stress. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 21-27, Jan. 1980.

KUSANO, H. et al. Molecular characterization of ONAC300, a novel NAC gene specifically expressed at early stages in various developing tissues of rice. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 272, n. 6, p. 616-626, Feb. 2005.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2006. 531 p.

LAUTERI, M. et al. Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. **Functional Ecology**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 675-683, Dec. 1997.

LEE, B. H.; HENDERSON, D. A.; ZHU, J. K. The Arabidopsis cold- responsive transcriptome and its regulation by ICE1. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 11, p. 55-75, 2005.

LIMA, A. L. S. et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 239-247, May 2002.

LIU, X. et al. Improved drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis overexpressing a NAC transcriptional factor from *Arachis hypogaea*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 75, n. 3, p. 443-450, Mar. 2011.

LOPES, B. F. et al. Photosynthesis and water vapor exchange of pigeonpea leaves in response to water deficit and recovery. **Crop Science**, Madison, v. 28, n. 1, p. 141-145, Jan. 1988.

MACHADO, E. C.; LAGÔA, A. M. M. A. Trocas gasosas e condutância estomática em três espécies de gramíneas. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 2, p. 141-149, 1994.

MAESTRI, M. et al. Accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in mature leaves of water stressed coffee plants (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*). **Journal of Horticultural Science**, London, v. 70, n. 2, p. 229-233, 1995.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 444, n. 2, p. 139-158, 2005.

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

MARTIM, S. A. **Pulverização do cafeeiro com açúcar**: potencial de uso em mudas submetidas a deficiência hídrica e na recuperação de plantas atingidas por Glyphosate. 2003. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

MATIELLI, A.; RUGGIERO, S. S. Agronegócio café: histórico e tendências. **Revista Cafeicultura**, Patrocínio, ano 2, n. 5, fev. 2005. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/noticia/11380/Agronegocio-cafe--historico-e-tendencias.html>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

MATIELLO, J. B.; DANTAS, S. F. A. Desenvolvimento do cafeeiro e do sistema radicular, com e sem irrigação, em Brejões, PE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 14., 1987, Campinas. **Resumos...** Campinas: UNICAMP, 1987. p. 165.

MATIELLO, J. B. et al. Maior vigor e resistência a seca em cafeeiro Siriema. **Revista Brasileira de Tecnologia Cafeeira**, Varginha, v. 1, n. 2, p. 29-30, jul./ago. 2004.

_____. Seleção de progênies de café visando resistência à ferrugem do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 9.; WORKSHOP INTERNACIONAL DE CAFÉ & SAÚDE, 4., 2003, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2003. p. 243.

MEINZER, F. C. et al. Leaf water relations and maintenance of gas exchange in coffee cultivars grown in drying soil. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, n. 4, p. 1781-1787, Dec. 1990.

MEIR, P. et al. The fate of assimilated carbon during drought: impacts on respiration in amazon rainforests. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences**, London, v. 363, n. 1498, p. 1848-1855, Feb. 2008.

MELO, B.; BARTHOLO, G. F.; MENDES, A. N. G. Café: variedades e cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 92-96, 1998.

MELO, E. F. **Modificações ecofisiológicas, bioquímicas e anatômicas em cafeeiro progênie Siriema sob deficiência hídrica**. 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MOHOTTI, A. J.; LAWLOR, D. W. Diurnal variation of photosynthesis and photoinhibition in tea: effects of irradiance and nitrogen supply during growth in the field. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 367, p. 313-322, Feb. 2002.

MORAN, J. F. et al. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta**, Berlin, v. 194, n. 3, p. 346-352, Aug. 1994.

NAKASHIMA, K. et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1819, n. 3, p. 97-103, 2012.

NASCIMENTO, S. P. do et al. Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. **Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 8, p. 853-860, 2011.

NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações em acerolas submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 75-87, 2001.

PASTENES, C.; HORTON, P. Effect of high temperature on photosynthesis in beans. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 112, n. 3, p. 1253-1260, Nov. 1996.

PAUL, M. J.; DRISCOLL, S. P. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source: sink imbalance. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 110-116, Jan. 1997.

PEARCY, R. W.; PFITSCH, W. A. Influence of sunflecks on the $\delta^{13}C$ of *Adenocaulon bicolor* plants occurring in contrasting forest understory microsites. **Oecologia**, Heidelberg, v. 86, n. 4, p. 457-462, 1991.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to longterm drought. **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 6, p. 1307-1314, Dec. 2004.

_____. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, London, v. 96, p. 101-108, May 2005.

PITMAN, J. I. Ecophysiology of tropical dry evergreen forest, Thailand: measured and modelled stomatal conductance of *Hopea ferrea*, a dominant canopy emergent. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 1366-1378, Dec. 1996.

PORTER, L. Light-dependent changes in biomass allocation and their importance for growth of rain forest tree species. **Functional Ecology**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 113-123, Feb. 2001.

PURANIK, S. et al. Molecular cloning and characterization of a membrane associated NAC family gene, SiNAC from foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 49, n. 2, p. 138-150, 2011.

RENA, A. B. et al. Coffee. In: CHAFFER, B.; ANDERSEN, P. C. (Ed.). **Handbook of environmental physiology of fruit crops: subtropical and tropical crops**. Boca Raton: CRC, 1994. v. 2, p. 101-122.

SALATI, E.; SANTOS, A. A. dos; NOBRE, C. **As mudanças climáticas globais e seus efeitos nos ecossistemas brasileiros**. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/clima/clima14.html>>. Acesso em: 12 nov. 2012.

SALVUCCI, M. E.; CRAFTS-BRANDNER, S. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of rubisco as a limiting factor in photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, n. 2, p. 179-186, Feb. 2004.

SCHROEDER, J. I. et al. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. **Nature**, London, v. 410, n. 6826, p. 327-330, Mar. 2001.

SHEN, Q.; HO, T. H. D. Functional dissection of an Abscisic Acid (ABA)-inducible gene reveals two independent aba-responsive complexes each containing a g-box and a novel cis-acting element. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 3, p. 295-307, Mar. 1995.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 115, n. 2, p. 327-334, 1997.

SILVA, E. A. et al. Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis in Arabica coffee trees. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 349-357, Oct. 2004.

SILVA, E. A.; MAZZAFERA, P. Influences of temperature and water in the coffee culture. **American Journal of Plant Science and Biotechnology**, Bethesda, v. 2, n. 1, p. 32-41, 2008.

SIMPSON, S. D. et al. Two different novel cis-acting elements of erd1, a clpA homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 259-270, Jan. 2003.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005. 640 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

TRIBUZY, E. S. **Variações da temperatura foliar do dossel e o efeito na taxa assimilatória de CO₂ na Amazônia Central**. 2005. 84 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

TURNER, N. C. Further progress in crop water relations. In: SPARKS, D. L. (Ed.). **Advances in agronomy**. New York: Academic, 1997. p. 293-337.

UNO, Y. et al. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 97, n. 21, p. 11632-11637, 2000.

VAVASSEUR, A.; RAGHAVENDRA, A. S. Guard cell metabolism and CO₂ sensing. **New Phytologist**, New York, v. 165, n. 3, p. 665-682, Mar. 2005.

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

WESTGATE, M. E. Water status and development of the maize endosperm and embryo during drought. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 1, p. 76-83, Jan./Feb. 1994.

WILLSON, K. C. **Coffee, cocoa and tea**. Cambridge: CABI, 1999. 300 p.

WINICOV, I.; BASTOLA, D. Salt tolerance in crop plants: new approaches through tissue culture and gene regulation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Pozann, v. 19, n. 4, p. 435-449, 1997.

WISE, R. R. et al. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown *Pima cotton* plants at high temperature. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 717-724, June 2004.

WORMER, T. M. The effect of soil moisture, nitrogen fertilization and some meteorological factors on stomata aperture of *Coffea arabica* L. **Annals of Botany**, London, v. 29, p. 523-539, 1965.

WRIGHT, I. J. et al. Irradiance, temperature and rainfall influence leaf dark respiration in woody plants: evidence from comparisons across 20 sites. **New Phytologist**, New York, v. 169, n. 2, p. 309-319, Feb. 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 236, n. 2, p. 331-340, 1993.

_____. Gene expression and signal 27 transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 11, n. 5, p. 327-334, 1997.

_____. Novel cis-acting element in an arabidopsis gene 1s involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 2, p. 251-264, Feb. 1994.

_____. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 5, p. 1292-1309, 2005.

YANG, S. D. et al. The *Arabidopsis* NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 6, p. 2155-2168, June 2011.

YONG, J. W. H.; WONG, S. C.; FARQUHAR, G. D. Stomatal responses to changes in vapour pressure difference between leaf and air. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 1213-1216, Oct. 1997.

ZEIGER, E. et al. The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century. **New Phytologist**, New York, v. 153, n. 3, p. 415-424, Mar. 2002.

ZHONG, R. et al. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in Arabidopsis. **Molecular Plant**, Oxford, v. 3, n. 6, p. 1087-1103, Nov. 2010.

ZHU, J.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Plant Science**, Shannon, v. 16, n. 2, p. 253-277, Feb. 1997.