

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

DANIELLY DUBBERSTEIN

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE 43 GENÓTIPOS DE *Coffea canephora*;
E IMPLICAÇÕES DO AUMENTO DE TEMPERATURA E DÉFICIT
HÍDRICO AO *Coffea* spp.**

**ALEGRE - ES
2019**

DANIELLY DUBBERSTEIN

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE 43 GENÓTIPOS DE *Coffea canephora*;
E IMPLICAÇÕES DO AUMENTO DE TEMPERATURA E DÉFICIT
HÍDRICO AO *Coffea* spp.**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Partelli

**ALEGRE - ES
2019**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Dubberstein, Danielly, 1989-

D813d Diversidade genética de 43 genótipos de Coffea canephora; e implicações do aumento de temperatura e déficit hídrico ao Coffea spp. / Danielly Dubberstein. - 2019. 168 f. : il.

Orientador: Fábio Luiz Partelli.

Coorientadores: Adésio Ferreira, José Cochicho Ramalho. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramentos) -

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Café. 2. Melhoramento genético. 3. Seleção de plantas. 4. Mudanças climáticas. 5. Calor. 6. Fotossíntese. I. Partelli, Fábio Luiz. II. Ferreira, Adésio. III. Cochicho Ramalho, José. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 631.523

DANIELLY DUBBERSTEIN

DIVERSIDADE GENÉTICA DE 43 GENÓTIPOS DE *Coffea canephora*; E IMPLICAÇÕES DO AUMENTO DE TEMPERATURA E DÉFICIT HIDRÍCO AO *Coffea* spp.

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento.

COMISSÃO EXAMINADORA



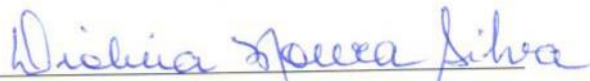
Prof. Dr. Fábio Luiz Partelli – (Orientador)
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Adésio Ferreira – (Coorientador)
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr. José Cochicho Ramalho – (Coorientador)
Instituto Superior de Agronomia-Universidade de Lisboa



Prof. Dra. Diolina Moura Silva
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr. Weverton Pereira Rodrigues
Universidade Estadual Norte Fluminense

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

OFEREÇO

Ao irmão Fábio e sobrinhos Iago e Ian.

A minha querida e amada vovó Leonira (em memória).

Aos meus avós Dedimundo e Luiza.

A todos meus familiares.

Aos produtores rurais, em especial os cafeicultores.

DEDICO

Aos meus pais Nilva Schreeder e Vantuir Dubberstein

Minha maior inspiração, meu maior incentivo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida; por me amparar, conceder força para vencer as dificuldades, por me dar coragem para as mudanças e novas escolhas e suprir todas as minhas necessidades.

A Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade na realização do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) Processo n°: 88881.132375/2016-01, que me proporcionou uma excelente oportunidade de conhecimento e experiência.

A União Europeia, através do Projecto BreedCAFS (proposta 727934), Programa Horizonte 2020, Edital, H2020-SFS-2016-2, Ação RIA, assim como de fundos nacionais da Fundação para a Ciência e a Tecnologia através das Unidades de Investigação UID/AGR/04129/ 2013 (LEAF) e UID/GEO/04035/2013 (GeoBioTec).

Ao Prof. Dr. Fábio Luiz Partelli, pelos excelentes seis anos de orientação e encorajamento contínuo na pesquisa.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento essenciais em minha formação, em especial ao Dr. Adésio Ferreira (co-orientador) e Doutorando José Henrique pelo apoio nas análises estatísticas.

Aos colegas de doutorado e mestrado Adelson Lemes da Silva Júnior, Clever Geraldo Coelho, Adriel Lima Nascimento, Cristiana Torres Leite, Felipe Torres Leite, Flávia Nicácio Viana, Robersta Pascoa, Glaucia de Mello Cunha, Jheniffer Abeldt Christ, Lucimara Cruz de Souza, Maressa Albuquerque Cortelete, João Paulo Oliveira, Leonardo Castro; também aos colegas de república e agregados Darley Aparecido Tavares Ferreira, Ronaldo Willian da Silva, Luis Moreira Junior, Adamastor Barros e demais amigos feitos no convívio de Alegre.

Ao Dr. José Cochicho Ramalho pela disponibilidade em me receber e orientar no doutorado sanduíche, pela amizade e apoio na condução e avaliação de experimentos e estadia em Portugal.

A Isabel P. Pais pelos excelentes ensinamentos em análises laboratoriais, pela amizade e apoio durante a estadia em Portugal.

Ao amigo e colega José Emanuel Nobre Semedo por compartilhar inúmeros momentos de aprendizados e descontração, pelas tantas palavras de apoio e motivação.

Ao amigo, colega de trabalho e pai postiço Antônio Eduardo Leitão, que por tantas vezes esteve comigo fazendo companhia em passeios, almoços, caronas, idas ao hospital, etc.

A todas as pessoas admiráveis que tive a oportunidade de trabalhar e adquirir aprendizado no período de doutorado sanduíche, em especial a Paula Alves, Paula Batista Santos, Ana Rodrigues, Ana Ribeiro, Nidia Rosa, Maria Cristina Simões-Costa, Ana Gomes, Paula Scotti, Fernando Lidon, Isabel Moura e Maria José Silva.

Aos amigos e funcionários da residência estudantil do INIAV que se tornaram minha família; em especial a Maria Umbelina Dias, Alexandrina Loureiro e Leia Castilho (em memória) que foram minhas mães postiças e meu alicerce em um período delicado, serei eternamente grata a elas. Aos admiráveis e adoráveis, Hélio Rocha, Maria Almeida, Eunice dos Anjos, Fredilson Melo, Benilde Francisco, Laura Macamo, Denise Camacho, Edenilson e Danilson Mascarenhas, Irina Fonseca, Abdulbasit Muzzammil Amin e Rui Filipe Martins e demais moradores da residência, muita gratidão pelos momentos de alegria, descontração e aprendizado!

Aos recentes e não menos importantes e especiais; Jéssica Dalazen, Juan Ricardo Rocha, Andréia Morais, Renan Malikouski, Pietra Rodrigues, Marcelo Altoé, Ivne Franco, Bruna Lara, Amanda Duim, Jaqueline Paris que se tornaram minha família em Guriri/São Mateus.

Agradeço a toda minha família e todos os amigos que considero parte da família, pelo apoio, amor, amizade e compreensão das inúmeras ausências durante este tempo.

BIOGRAFIA

Danielly Dubberstein, nascida em São Gabriel da Palha, Estado do Espírito Santo, em 22 de janeiro de 1989, filha de Vantuir Dubberstein e Nilva Schreeder Dubberstein. Cursou os estudos fundamentais nas escolas Ivete Vargas e Pedro Aleixo na zonal rural do município de Alta Floresta D'Oeste, estado de Rondônia. Em 2007, ingressou na Universidade Federal de Rondônia, na cidade de Rolim de Moura, com o propósito de se tornar Engenheira Agrônoma, o que foi concluído em dezembro de 2011. Em março de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical do Centro Universitário Norte do Estado do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical, o que foi concluído em fevereiro de 2015. Em março do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento, área de concentração Melhoramento de Plantas, sendo parte realizada em modalidade Doutorado sanduíche (PDSE-CAPES) no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa-Portugal no período de abril de 2017 a março de 2018. A obtenção do título de doutora em Genética e Melhoramento ocorreu em 27 de fevereiro de 2019.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
OVERVIEW	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO 1	11
DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE 43 GENÓTIPOS DE <i>Coffea canephora</i> A PARTIR DE CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS FOLIARES.....	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 2	32
DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE <i>Coffea canephora</i> POR CARACTERES AGRONÔMICOS	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	47
CAPÍTULO 3	53
DIFERENTES AGRUPAMENTOS E EQUAÇÕES PARA ESTIMATIVA DA ÁREA FOLIAR DE GENÓTIPOS DE <i>Coffea canephora</i>	53
INTRODUÇÃO	54
MATERIAL E MÉTODOS	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	66
CAPÍTULO 4	69
IMPACTOS DO AUMENTO DE TEMPERATURAS E DÉFICIT HÍDRICO NA MAQUINÁRIA FOTOSSINTÉTICA DE <i>Coffea</i> spp.	69
INTRODUÇÃO	71
MATERIAIS E MÉTODOS	74

RESULTADOS	80
DISCUSSÃO	94
CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS.....	112
CAPÍTULO 5	125
MECANISMOS DE PROTEÇÃO EM CAFEEIROS FACE AOS ESTRESSES HÍDRICOS E CALOR.....	125
INTRODUÇÃO	127
MATERIAL E MÉTODOS	129
RESULTADOS	133
DISCUSSÃO	142
CONCLUSÕES	150
REFERÊNCIAS.....	151

RESUMO GERAL

Os capítulos 1, 2 e 3 têm como objetivo o estudo da diversidade genética de 43 genótipos de *Coffea canephora* inéditos através de características morfológicas foliares estomáticas e da planta, e ainda a escolha de um modelo matemático para determinação de área foliar desenvolvido a partir de medidas lineares de folha. No capítulo 1 foi feito o estudo das características estomáticas determinando: contagem de células epidérmicas e número de estômatos, medida de diâmetro polar e equatorial, estimativa de densidade, índice de área estomática, índice estomático e funcionalidade estomática. Os dados foram submetidos à análise de variância, agrupadas pelo método hierárquico *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA); fez-se ainda a correlação linear de Pearson e análise por componentes principais em Biplot. Foram constatadas diferenças entre os 43 genótipos confirmando a existência de variabilidade genética; o método de agrupamento distinguiu-os em seis grupos; correlações com distintos níveis significância ocorreram entre os parâmetros; altura de planta, distância entrenós e área foliar se correlacionam positivamente, mostrando que podem ser associadas com as características estomáticas. No capítulo 2 foram estimados: comprimento, número de nós e distância entre nós de ramos plagiotrópico e ortotrópico; altura de planta; diâmetro de copa; comprimento, largura e área foliar real de folhas em duas avaliações. Os dados foram submetidos à análise de variância, agrupadas pelo método otimização de Tocher e pelo método hierárquico UPGMA, feita à análise de correlação linear de Pearson e componentes principais em Biplot. Constatou-se diferenças significativas entre os 43 genótipos, formando seis grupos pelo método de Tocher e cinco grupos por UPGMA, evidenciando a variabilidade genética existente. A correlação de Pearson forneceu valores com distintos níveis entre as características, comprovados pela análise de componentes principais. No capítulo 3 foi medido manualmente o comprimento da nervura central (C) e máxima largura do limbo foliar (L), e área foliar real (AF) de folhas dos 43 genótipos. A partir do C, L, AF e CL realizaram-se análises de correlação de Pearson, agrupamento pelo método otimização de Tocher, testaram-se todas as combinações por modelos lineares conforme os parâmetros existentes e ajustaram-se os valores de R^2 e o BIC para cada modelo, sendo estabelecidas as equações considerando os parâmetros β_0 e β_1 . Os 43 genótipos foram divididos em três grupos pelo método de Tocher, sendo que um dos grupos abrangeu 41 genótipos. Maiores correlações ocorreram entre produto de C e L (CL) e AF, seguido de L e AF. Portanto, CL estimou satisfatoriamente a área foliar, mas pode ser adotada a variável largura devida maior facilidade de medição a campo. As equações geradas considerando ambas variáveis foram significativas e a validação cruzada confirmou o

ajustamento. O capítulo 4 objetivou avaliar os impactos dos estresses de calor e seca individuais e em conjunto nos cafeeiros, sendo que foram avaliados parâmetros foliares relacionados a características estomáticas, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, transporte tilacóidal de elétrons, permeabilidade de membrana e atividades das enzimas da fotossíntese. Adicionalmente, o capítulo 5 teve como finalidade identificar mecanismos de resposta/aclimatação das plantas as condições de estresse de calor e seca, onde foram avaliados a fotoinibição do *PSII*, as atividades das enzimas Ascorbato Peroxidase (*APX*), Glutaciona Redutase (*GR*), Superóxido Dismutase (*Cu*, *Zn-SOD*), assim como o teor de Ascorbato (*ASC*), enzima de choque térmico (*HSP70*), pigmentos fotossintéticos e malondialdeído (*MDA*). Notou-se que as plantas bem regadas mantiveram bom desempenho fotossintético com aumento de temperatura, apresentando alterações somente a 39/30 °C em CL153 e Icatu a partir de 34/28 °C assim como houve aumento de F_o e diminuição em F_v/F_m e aumento no nível de fotoinibição do *PSII*, entretanto as plantas em estresse hídrico apresentaram reduções significativas em todos os parâmetros (P_n , g_s , E , C_i , $iWUE$ e A_{max}) e o efeito do calor nestas plantas foi mais evidente a 42/30 °C apenas em Icatu. A imposição conjunta dos estresses agrava a situação, embora alguns parâmetros não tenham sido modificados (por exemplo: P_n e A_{max} em CL 153). A atividade das enzimas da fotossíntese e dos fotossistemas foram diminuídos com a imposição simultânea de seca e calor. As estruturas fotossintéticas em geral, e os fotossistemas em particular, foram impactados, mas os efeitos negativos terão sido mitigados pelo reforço de mecanismos protetores. Estes estão refletidos nos aumentos dos valores de $Y_{(NPQ)}$ (dissipação de energia não regulada) e q_N (dissipação térmica sustentada fotoprotetora), *HPS70*, (que confere aumento da termotolerância) e de alguns pigmentos fotossintéticos como Neaxantina, Anteraxantina, Zeaxantina, DEPS e Luteína, bem como no aumento de atividade de *APX*, *SOD* e *GR* (que atuam na remoção de espécies reativas de oxigênio). O teor de *MDA* foi aumentado apenas em 42/30 °C, confirmando a peroxidação de lipídios de membrana, contudo evidenciando a termotolerância foliar nos cafeeiros a temperaturas bem acima do ótimo. Além disso, foi visto uma considerável recuperação para diversos parâmetros após reestabelecimento das condições normais de água e temperatura, confirmando a capacidade de resiliência dos cafeeiros.

Palavras chave: diversidade genética, seleção, melhoramento, alterações climáticas, fotoinibição, estresse hídrico, estresse térmico, antioxidantes.

OVERVIEW

Chapters 1, 2 and 3 have the objective of studying the genetics of the 43 unpublished *Coffea canephora* genotypes through the stomatal and plant leaf morphological characteristics, as well as the choice of a mathematical model to determine the leaf area developed from linear of sheet. In chapter 1 the study of the stomatal characteristics was carried out, determining: epidermal cell count and number of stomata, polar and equatorial diameter measurement, density estimation, stomatal area index, stomatal index and stomatal functionality. Data were submitted to analysis of variance, grouped by the hierarchical method Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA); Pearson's linear correlation and principal component analysis in Biplot were also performed. Differences were observed among the 43 genotypes confirming the existence of genetic variability; the grouping method distinguished them into six groups; correlations with different levels of significance occurred among the parameters; plant height, distance internodes and leaf area correlate positively, showing that they can be associated with stomatal characteristics. In chapter 2 we estimated: length, number of nodes and distance between nodes of plagiotropic and orthotropic branches; plant height; cup diameter; length, width and actual leaf area of leaves in two evaluations. The data were submitted to analysis of variance, grouped by the Tocher optimization method and by the UPGMA hierarchical method, made to the analysis of Pearson's linear correlation and main components in Biplot. Significant differences were found among the 43 genotypes, forming six groups by the Tocher method and five groups by UPGMA, evidencing the existing genetic variability. Pearson's correlation provided values with different levels between characteristics, as evidenced by principal component analysis. In Chapter 3, the length of the midrib (L) and maximum leaf blade width (W) and leaf area (LA) of the 43 genotypes were measured manually. From L, W, LA and LW, Pearson correlation analyzes were performed, grouped by the Tocher optimization method, all combinations were tested by linear models according to the existing parameters and the values of R^2 and BIC were adjusted for each model. Established the equations considering the parameters β_0 and β_1 . The 43 genotypes were divided into three groups by the Tocher method and one group with 41 genotypes. Larger correlations occurred between products L and W (LW) and LA, followed by W and LA. Therefore, LW estimates the leaf area satisfactorily, but the variable width can be adopted due to the greater ease of measurement in the field. The equations generated considering the two variables were significant and the cross validation confirmed the adjustment. The objective of chapter 4 was to evaluate the impacts of individual and joint heat and drought stresses in coffee trees. Leaf parameters related to stomatal characteristics, gas

exchange, chlorophyll a fluorescence, thylakoidal electron transport, membrane permeability and activities of photosynthesis enzymes. In addition, chapter 5 aimed to identify mechanisms of response/acclimation of plants to heat and dry stress conditions, where they were evaluated the photoinhibition of *PSII*, the activities of the enzymes Ascorbate Peroxidase (*APX*), Glutathione Reductase (*GR*), Superoxide Dismutase (*Cu, Zn-SOD*) as well as Ascorbate (*ASC*) content, heat shock enzyme (*HSP70*), photosynthetic pigments and malondialdehyde (*MDA*). It was observed that well-watered plants maintained good photosynthetic performance with temperature increase, presenting changes only at 39/30 °C in CL153 and Icatu from 34/28 °C as well as there was increase of *Fo* and decrease in *Fv/Fm* (*Pn, Gs, E, Ci, iWUE* and *Amax*), and the effect of heat on these plants was more evident at 42/30 °C only in Icatu. The joint imposition of stressors aggravates the situation, although some parameters have not been modified (for example: *Pn* and *Amax* in CL 153). The activity of the photosynthesis and photosynthetic enzymes was reduced with the simultaneous imposition of drought and heat. The photosynthetic structures in general, and the photosystems in particular, have been impacted, but the negative effects have been mitigated by the reinforcement of protective mechanisms. These are reflected in the increases in the values of $Y_{(NPQ)}$ (unregulated energy dissipation) and qN (sustained heat dissipation photoprotective), *HPS70*, and some photosynthetic pigments such as Neaxanthin, Antheraxanthin, Zeaxanthin, DEPS and Lutein, as well as increased *APX*, *SOD* and *GR* activity (which act in the removal of reactive oxygen species). The *MDA* content was increased only at 42/30 °C, confirming the membrane lipid peroxidation, but evidencing the leaf thermotolerance in the coffee trees at temperatures well above the optimum. In addition, a considerable recovery was observed for several parameters after reestablishment of the normal water and temperature conditions, confirming the resilience of the coffee trees.

Key words: genetic diversity, selection, breeding, climate change, photoinhibition, water stress, thermal stress, antioxidants.

INTRODUÇÃO GERAL

O café, uma espécie tropical perene, é uma das commodities mais negociadas globalmente. A cadeia de valor da safra gera uma receita de aproximadamente US \$ 170 milhões e envolve ca. 25 milhões de produtores, na sua maioria pequenos e ca. 125 milhões de pessoas em toda a cadeia produtiva, tendo um forte impacto social e econômico em muitos países tropicais (BUNN et al., 2015, RAMALHO et al., 2018; ICO, 2018; DAVIS et al., 2019). A produção mundial é baseada em *Coffea arabica* L. (café arábica) e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (café conilon/robusta), que corresponde a 2/3 e 1/3 do rendimento da cultura, respectivamente (DAVIS et al., 2011).

Brasil, Vietnã, Colômbia, Indonésia, Etiópia, Índia, Honduras e Uganda são responsáveis pelo maior montante da produção mundial, que tem aumentado continuamente nas últimas décadas, estando consistentemente perto ou acima de 9 milhões de toneladas desde 2011/2012 (ICO, 2018). O Brasil se destaca por ser o maior produtor e exportador mundial de café, no qual a produção é dividida entre arábica e conilon/robusta. Em 2018 o café arábica correspondeu ao montante de 47,5 milhões de sacas e de conilon foi 14,2 milhões de sacas, totalizando 61,7 milhões de sacas beneficiadas, oriundas de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Rondônia e Bahia, os principais estados produtores (CONAB, 2018).

Com relação ao *C. canephora* a produção e demanda tem aumentado expressivamente nos últimos anos, devido a maior participação na composição dos *blends* e como café solúvel, pois conferem a bebida maior teor de sólidos solúveis, maior rendimento industrial e encorpamento a bebida (IVOGLIO et al., 2008; LIMA FILHO et al., 2012, 2015; TEIXEIRA et al., 2016), além disso a mistura diminui os custos em vista do preço ser menor do que o café arábica, podendo compor até 60% dos *blends*. Assim, o café Robusta foi transformado de uma cultura africana pouco conhecida para uma importante commodity global em apenas 150 anos e atualmente corresponde por 1/3 do comércio global de café (ICO, 2018; DAVIS et al., 2019).

As características de alogamia e auto-incompatibilidade gametofítica do tipo monogênica do *C. canephora* (CONAGIN e MENDES, 1961), confere a reprodução natural indivíduos altamente heterozigotos e populações com grande variabilidade genética (BRAGANÇA et al., 2001; FERRÃO et al., 2008; IVOGLIO et al., 2008), podendo diferir quanto ao ciclo de maturação, produtividade, resistência a pragas e doenças, porte, arquitetura, tamanho e forma das sementes, frutos e folhas (BRAGANÇA et al., 2001; PARTELLI et al., 2006; 2014). Essa diversidade é altamente necessária em programas de

melhoramento, favorecendo a seleção de genótipos superiores com as características desejadas (CHARRIER e BERTHAUD, 1985; DALCOMO et al., 2015). Assim com a disponibilidade de novos materiais em campo, é essencial a avaliação e caracterização das plantas e a adoção de técnicas multivariadas permite a identificação e seleção de genótipos promissores e/ou distintos (CRUZ, REGAZZI, CARNEIRO, 2012; CARMONA et al., 2015; DALCOMO et al., 2015), para compor novas cultivares ou serem mantidas em bancos de germoplasma para eventuais programas de melhoramento da cultura. Logo esforços em estudos neste sentido podem colaborar para a manutenção da atividade cafeeira.

A cafeicultura mundial e local está enfrentando desafios crescentes diante das alterações climáticas para o presente século, incluindo a subida de temperaturas médias globais e o aumento da frequência de eventos climáticos extremos, como secas e ondas de calor (HAWORTH et al., 2018). Os impactos ocorrem tanto na produção como na qualidade da bebida, afetando potencialmente toda a cadeia de valor do café, desde os produtores, passando pela indústria e até os consumidores de café (MARTINS et al., 2016). Essas alterações já têm sido expostas em diversos estudos, sendo que países produtores como Brasil, México, Tanzânia e Nicarágua já registraram perdas severas em produção e até mesmo áreas aptas para o cultivo (DUBBERSTEIN et al., 2018; SEMEDO et al., 2018). Recentemente foi publicado um estudo relatando que 60% das espécies de café conhecidas no mundo correm risco de extinção, inclusive *C. arabica*, que se destaca como café mais consumido no planeta, estando fortemente ameaçado pelas mudanças climáticas globais (DAVIS et al., 2019).

O aumento de temperatura e evento de períodos de seca ocorrendo individualmente ou em sobreposição constituem as maiores ameaças climática para agricultura em geral (DUBBERSTEIN et al., 2018; HAWORTH et al., 2018), para a cafeicultura em particular. Temperaturas extremas e escassez de água ocorrem juntas frequentemente, podendo a interação entre estresses levar a um aumento da severidade do impacto sobre o metabolismo, equilíbrio mineral e expressão gênica (RAMALHO et al., 2018). Ambas as tensões podem afetar potencialmente todos os componentes fotossintéticos, ocasionando fechamento estomático (reduzindo assim a fotossíntese líquida e o metabolismo dos açúcares), alterações nos complexos pigmentares, redução da eficiência fotoquímica e atividade das enzimas e fotoinibição dos fotossistemas (PARTELLI et al., 2009, 2011; RODRIGUES et al., 2016; MARTINS et al., 2016; RAMALHO et al., 2018).

Um resultado direto de alterações celulares induzidas por estresse é a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HASANUZZAMAN et al., 2013; TESKEY et al., 2015; AWASTHI et al., 2018), geradas a partir do excesso de energia, devido ao seu uso

limitado nas reações fotoquímicas. Tal pode promover a fotoxidação e fotoinibição, definidos como a inibição da fotossíntese pelo excesso de luz, com dano direto na proteína D1, danos ao RNA e DNA, destruindo funções celulares e metabólicas, lesões na matriz lipídica de membranas, que podem contribuir para aumento do vazamento de eletrólitos, e inclusive resultar em morte celular (MENEZES-SILVA et al., 2017; YANG et al., 2018). Contudo, as plantas contam com mecanismos de eliminação/desintoxicação que controlam a produção e presença de ROS, pelo que uma regulação positiva destes mecanismos é decisivo para a tolerância ao estresse das plantas. Dentre estes se destacam a atuação de dissipadores de energia, sobre-expressão de enzimas antioxidantes e ação de metabólitos não enzimáticos (RODRIGUES et al., 2016; MARTINS et al., 2016; RAMALHO et al., 2018).

Diante do contexto o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética existente entre 43 genótipos de *C. canephora* a partir de características estomáticas e biométricas da planta, bem como desenvolver um modelo matemático para aferir área foliar de diferentes materiais a partir de medidas lineares de folhas. A outra linha de pesquisa investigou as consequências de três condições de estresse ambiental, nomeadamente seca e calor imposto individualmente ou em conjunto em *C. arabica* cv Icatu e *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 ao nível do funcionamento das estruturas fotossintéticas, bem como os mecanismos de defesa que são expressos e sua eficiência na proteção contra o agravamento dos danos e a capacidade de resiliência do cafeeiro de recuperação após estabelecimento das condições normais se água e temperatura.

REFERÊNCIAS

- AWASTHI, R.; BHANDARI, K.; NAYYAR, H. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Frontiers in Environmental Science*, v. 3, p. 11, 2015. DOI: <https://doi.org/0.3389/fenvs.2015.00011>.
- BRAGANÇA, S.M.; CARVALHO, C.H.S.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G. Variedades clonais de café Conilon lançadas para o estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2001000500006>.
- BUNN, C.; LÄDERACH, P.; RIVERA, O.O.; KIRSCHKE, D. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Climatic Change*, v. 129, p. 89-101, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10584-014-1306-x>.
- CARMONA, P.A.O.; PEIXOTO, J.R.; AMARO, G.B.; MENDONÇA, M.A. Divergência genética entre acessos de batata-doce utilizando descritores morfoagronômicos das raízes. *Horticultura Brasileira*, v. 33, n. 2, p. 241-250, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000200017>.

- CHARRIER A, BERTHAUD J. Botanical classification of Coffee. In: Clifford MN, Willson KC. Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage. 1985. p.13-47. Crom Helm, London.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de café, v. 5– Safra 2018, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-84, 2018.
- CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia*, v. 20, n. 1, p. 787-804, 1961. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051961000100034>.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético. 4. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2012. 514p.
- DALCOMO, J.M.; VIEIRA, H.D.; FERREIRA, A.; LIMA, W.L.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G.; PARTELLI, F.L. Evaluation of genetic divergence among clones of conilon coffee after scheduled cycle pruning. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 4, p. 15417-15426, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015>.
- DAVIS, A.P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M.F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 167, p. 357-377, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>.
- DAVIS, A.P.; CHADBURN, H.; MOAT, J.; O’SULLIVAN, R.; HARGREAVES, S.; LUGHADHA, E.N. High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. *Science Advances*, v. 5, n. 1, eaav3473, 2019. DOI: [10.1126/sciadv.aav3473](https://doi.org/10.1126/sciadv.aav3473).
- DUBBERSTEIN, D.; RODRIGUES, W.P.; SEMEDO, J.N.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; REBOREDO, F.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LIDON, F.C.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Mitigation of the Negative Impact of Warming on the Coffee Crop: The Role of Increased Air [CO₂] and Management Strategies. In: Shanker, A. (Edi). *Climate Resilient Agriculture, Strategies and Perspectives*. Londres: IntechOpen, Cap. 4, p. 58-85, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.72374>.
- FERRÃO, R.G.; CRUZ, C.D.; FERREIRA, A.; CECON, P.R.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.F.; CARNEIRO, P.C.S.; SILVA, M.F. Parâmetros genéticos em café Conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-69, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000100009>.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ALAM, M.M.; ROYCHOWDHURY, R.; FUJITA, M. Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Science*, v. 14, n. 5, p. 9643-84. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14059643>.
- HAWORTH, M.; MARINO, G.; BRUNETTI, C.; KILLI, D.; DE CARLO, A.; CENTRITTO, M. The Impact of Heat Stress and Water Deficit on the Photosynthetic and Stomatal Physiology of Olive (*Olea europaea* L.) A Case Study of the 2017 Heat Wave. *Plants*, v. 7, n. 4, p. 76, 2018b. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants7040076>.
- IVOGLO, M.G.; FAZUOLI, L.C.; OLIVEIRA, A.C.B.; GALLO, P.B.; MISTRO, J.C.; SILVAROLLA, M.B.; TOMA-BRAGHINI, M. Divergência genética entre progênies de café

robusta. *Bragantia*, v. 67, n. 4, p. 823-831, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000400003>.

LIMA FILHO, T.; DELLA LUCIA, S.M.; SARAIVA, S.H.; CARNEIRO, J.C.S.; ROBERTO, C.D. Perfil sensorial e aceitabilidade de bebidas de café tipo expresso preparadas a partir de *blends* de café arábica e conilon. *Enciclopédia Biosfera*, v. 7, n. 12, p. 1-17, 2011.

LIMA FILHO, T.; DELLA LUCIA, S.M.; SARAIVA, S.H.; LIMA, R.M. Características físico-químicas de bebidas de café tipo expresso preparadas a partir de *blends* de café arábica e conilon. *Revista Ceres*, v. 62, n. 4, p. 333-339, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201562040001>.

MARTINS, M.Q.; RODRIGUES, W.P.; FORTUNATO, A.S.; LEITÃO, A.E.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SILVA, M.J.; REBOREDO, F.H.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.J.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Protective Response Mechanisms to Heat Stress in Interaction with High [CO₂] Conditions in *Coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*, v. 29, p. 947-964, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00947>.

MENEZES-SILVA, P.E.; SANGLARD, L.M.P.V.; ÁVILA, R.T.; MORAIS, L.E.; MARTINS, S.C.V.; NOBRES, P.; PATREZE, C.M.; FERREIRA, M.A.; ARAÚJO, W.L.; FERNIE, A.R.; DAMATTA, F.M. Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. *Journal of Experimental Botany*, v. 68, p. 4309-4322, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx211>.

PARTELLI F.L., BATISTA-SANTOS P., CAMPOS P.S., PAIS I.P., QUARTIN V.L., VIEIRA H.D., RAMALHO J.C. Characterization of the Main Lipid Components of Chloroplast Membranes and Cold Induced Changes in *Coffea* sp. *Environmental and Experimental Botany*, v. 74, p. 194-204, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.06.001>.

PARTELLI F.L., VIEIRA H.D., VIANA A.P., BATISTA-SANTOS P., LEITÃO A.E., RAMALHO J.C. Low Temperature Impact on Photosynthetic Parameters in Coffee Genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 11, p. 1404-1415, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009001100006>.

PARTELLI, F.L.; COVRE, A.M.; OLIVEIRA, M.G.; ALEXANDRE, R.S.; VITÓRIA, E.L.; SILVA, M.B. Root system distribution and yield of 'Conilon' coffee propagated by seeds or cuttings. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 49, n. 5, p. 349-355, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000500004>

PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; SANTIAGO, A.R.; BARROSO, D.G. Produção e desenvolvimento radicular de plantas de café 'Conilon' propagadas por sementes e por estacas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 6, p. 949-954, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000600008>.

RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; LIDON, F.C.; MARQUES, L.M.C.; LEITÃO A.E.; FORTUNATO, A.S.; PAIS, I.P.; SILVA, M.J.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LOPES, A.; REBOREDO, F.H.; RIBEIRO-BARROS, A.I. Stress cross-response of the antioxidative system promoted by superimposed drought and cold conditions in *Coffea* spp.. *PLOS ONE*, v. 13, n. 6, e0198694, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198694>.

RODRIGUES, W.P.; MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.S.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; SIMÕES-COSTA, M.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; COLWELL, F.;

- GOULAO, L.; MÁGUAS, C.; MAIA, R.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supraoptimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Global Change Biology*, v. 22, p. 415-431, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.13088>.
- SEMEDO, J.N.; RODRIGUES, W.P.; DUBBERSTEIN, D.; MARTINS, M.Q.; MARTINS, L.D.; PAIS, I.P.; RODRIGUES, A.P.; LEITÃO, A.E.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A.; REBOREDO, F.H.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.J.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Coffee Responses to Drought, Warming and High [CO₂] in a Context of Future Climate Change Scenarios. In: ALVES, F.; LEAL FILHO, W.; AZEITEIRO, U. (Edi). *Climate Change Management. Theory and Practice of Climate Adaptation*. Springer, Cap. 26, p. 465-477. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72874-2>.
- TEIXEIRA, O.R.; PASSOS, F.R.; MENDES, F.Q. Qualidade físico-química e microscópica de 14 marcas comerciais de café torrado e moído. *Coffee Science*, v. 11, n. 3, p. 395-402, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v11i3.1111>.
- TESKEY, R.; WERTN, T.; BAUWERAERTS, I.; AMEYE, M.; MCGUIRE, M.A.; STEPPE, K. Responses of tree species to heat waves and extreme heat events. *Plant, Cell & Environment*, v. 38, p. 1699-1712, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12417>
- YANG, L.; FOUNTAIN, J.C.; JI, P.; NI, X.; CHEN, S.; LEE, R.D.; KEMERAIT, R.C.; GUO, B. Deciphering drought-induced metabolic responses and regulation in developing maize kernels. *Plant Biotechnology Journal*, v. 16, p. 1616-1628, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.12899>.

CAPÍTULO 1

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE 43 GENÓTIPOS DE *Coffea canephora* A PARTIR DE CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS FOLIARES

RESUMO: O conhecimento de características da estrutura interna das folhas é importante para discriminar genótipos em processos de seleção e melhoramento, pois podem indicar diferentes aptidões as condições de cultivo. Diante disso, este trabalho tem como objetivo averiguar a variabilidade genética de 43 genótipos de *Coffea canephora* a partir de características anatômicas foliares e conhecer a correlação existente entre as características. Logo, estimaram-se oito características anatômicas foliares: CE (número de células epidérmicas); NE (número de estômatos); DP (diâmetro polar); DQ (diâmetro equatorial); DE (densidade estomática); IAE (índice de área estomática); IE (índice estomático) e a FUN (funcionalidade estomática) e aferiu a altura de planta, distância entrenós e área foliar dos 43 genótipos. Os dados foram submetidos à análise de variância multivariada (MANOVA) e agrupadas pelo método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*). Ainda, foram submetidas à análise de correlação linear de Pearson e componentes principais em gráfico de dispersão do tipo Biplot. A análise de variância constatou diferenças entre os 43 genótipos para todas as características anatômicas, sendo que o método de agrupamento distinguiu-os em seis grupos, o que definiu as divisões dos genótipos nos respectivos grupos foi menor ou maior número de células epidérmicas, número e tamanho dos estômatos, de forma que evidenciou a heterogeneidade na constituição genética da população. Houve correlações positivas e negativas com níveis de significância desde fraco a forte entre as características, sendo os maiores entre NE x IE e DE; DP e DQ x IAE, além disso, altura de planta, distância entrenós e área foliar se correlacionam positivamente, mostrando que estas características são geneticamente associadas umas as outras. Estes resultados ressaltam a necessidade de considerar os estômatos na identificação e desenvolvimento de cultivares de café adequado aos ambientes em mudança.

PALAVRAS-CHAVE: café conilon, estômatos, variabilidade genética, agrupamento.

GENETIC DIVERGENCE AMONG 43 *Coffea canephora* GENOTYPES FROM FOLIAR ANATOMICAL CHARACTERISTICS

ABSTRACT: The knowledge of the characteristics of the internal structure of the leaves is important to discriminate genotypes in selection and breeding processes, as they may indicate different cultivation conditions. Therefore, the objective of this work is to investigate the genetic variability of 43 genotypes of *Coffea canephora* from leaf anatomical characteristics and to know the correlation between the characteristics. Therefore, eight leaf anatomical characteristics were estimated: EC (number of epidermal cells); NS (number of stomata); PD (polar diameter); QD (equatorial diameter); SD (stomatal density); SAI (stomatal area index); SI (stomatal index) and FUN (stomatal functionality), and verified the plant height, internodes distance and leaf area of the 43 genotypes. The data were submitted to the multivariate analysis of variance (MANOVA) and grouped by the UPGMA hierarchical method (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). Also, they were submitted to Pearson's linear correlation analysis and main components in a Biplot type scatter plot. The analysis of variance found differences among the 43 genotypes for all anatomical characteristics, and the grouping method distinguished them in six groups, which defined the divisions of the genotypes in the respective groups were smaller or larger number of epidermal cells, number and size of the stomata, so that it showed the heterogeneity in the genetic constitution of the population. There were positive and negative correlations with levels of significance ranging from weak to strong among the characteristics, the highest among NS x SI and SD; PD and QD x SAI, in addition, plant height, distance internodes and leaf area correlate positively, showing that these characteristics are genetically associated with each other. These results highlight the need to consider stomata in the identification and development of coffee cultivars suitable for changing environments.

KEY WORDS: coffee conilon, stomata, genetic variability, clustering.

INTRODUÇÃO

O café dito com um dos mais valiosos produtos da economia global é cultivado em mais de 11 milhões de hectares, distribuído em cerca de 80 países (DENOEUDE et al., 2014; DAMATTA et al., 2015; 2018). As espécies *C. arabica* Linnaeu e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner se consagram com maior importância comercial. A produção e demanda de *C. canephora* tem aumentado de forma significativa, participando na composição dos blends juntamente com café arábica e nas indústrias de torrado e moído (expresso e solúvel), fato atribuído ao maior teor de sólidos solúveis, maior rendimento industrial e conferir corpo a bebida (IVOGLO et al., 2008; LIMA FILHO et al., 2012, 2015; TEIXEIRA et al., 2016),

podendo em muitos casos compor cerca de 60% em *blends* sem que comprometa a qualidade final (LIMA FILHO et al., 2015).

A espécie *C. canephora* é diplóide ($2n=2x=22$ cromossomos) e alógama, com auto-incompatibilidade gametofítica do tipo monogênica ligada a um único loco gênico “S”, com cerca de três alelos interagindo, impedindo autofecundação e cruzamento de indivíduos portadores de alelos semelhantes (CONAGIN e MENDES, 1961; DENOEUDE et al., 2014; DALCOMO et al., 2017; MORAES et al., 2018). Logo, a reprodução natural promove indivíduos altamente heterozigotos e populações com grande variabilidade genética (BRAGANÇA et al., 2001; FERRÃO et al., 2008; IVOGLO et al., 2008), com distintos ciclos de maturação, produtividade, resistência a pragas e doenças, porte, arquitetura, tamanho e forma das sementes, frutos e folhas, qualidade de bebida, além disso, são menos produtivas (BRAGANÇA et al., 2001; PARTELLI et al., 2006; 2014; CHENG et al., 2016; DALCOMO et al., 2017). Plantas com estas características se consagram como matéria-prima para programas de melhoramento devido à existência de variabilidade genética, condição favorável para a seleção de genótipos superiores (IVOGLO et al., 2008; DALCOMO et al., 2015; MACHADO et al., 2017).

Regularmente novos genótipos de conilon/robusta originam-se no campo, a partir da seleção, multiplicação e exploração empírica dos próprios cafeicultores, estudos científicos através da avaliação de características agrônômicas permite estimar diversos parâmetros genéticos e identificar genótipos promissores e/ou distintos para compor uma nova cultivar com auxílio de técnicas multivariadas (CRUZ et al., 2012; CARMONA et al., 2015; DALCOMO et al., 2015; BIKILA e SAKIYAMA, 2017; GILES et al., 2018, 2019).

As características foliares variam entre os genótipos e são extremamente úteis na identificação de plantas com características desejáveis como resistência a determinadas condições ambientais, pois a anatomia foliar do cafeeiro demonstra plasticidade diante de alguns estresses abióticos, alterando as espessuras do parênquima paliádico e esponjoso, número de estômatos, posicionamento, dimensões e mobilidade estomática. Inclusive o conhecimento de tais características pode auxiliar na escolha de materiais com maior potencial fotossintético, pois o aumento na densidade estomática pode proporcionar uma maior capacidade em captação e fixação do CO₂ atmosférico e, dessa forma, melhorar a eficiência fotossintética e produção de fotoassimilados (BATISTA et al., 2010; BALIZA et al., 2012; GAMA et al., 2017; DITTBERNER et al., 2018).

Em vista da possível diversidade existente quanto as característica estomática e seu impotante papel na seleção de plantas, objetivou-se com este trabalho estudar uma população

de 43 genótipos de *C. canephora* através da estimativa de parâmetros genéticos, método de agrupamento UPGMA e análise de correlação a partir das características anatômicas foliares e biométricas da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em uma lavoura composta por 43 genótipos de *C. canephora*, sendo a maioria selecionada por cafeicultores da região, ou seja, são inéditos em pesquisa científica. O plantio ocorreu em abril de 2014 no município de Nova Venécia, região norte do Estado do Espírito Santo, Brasil, em uma propriedade particular localizada a uma latitude 18°66'23" sul e longitude 40°43'07" oeste, altitude de 50 metros, temperatura média anual é de 23°C. A região possui clima tropical, caracterizado pelo verão quente e úmido, e inverno seco, classificado como Aw, de acordo com a classificação de Köppen (ALVARES et al., 2013).

Os genótipos foram dispostos em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições, sendo os tratamentos constituídos pelos diferentes genótipos, e cada unidade experimental por sete plantas. O plantio foi realizado no espaçamento de 3 metros entre linhas e 1 metro entre plantas (3x1), o que equivale a 3333 plantas por hectare. Dos 43 genótipos implantados 42 são propagados por estaquia e um por semente, as quais foram conduzidas com quatro hastes por planta. Toda área experimental possuiu irrigação por gotejamento desde a implantação.

As coletas foliares foram feitas no terceiro ou quarta par de folhas recém-desenvolvidas, de ramos plagiotrópicos situados no terço médio das plantas expostas ao sol, num total de 15 folhas por genótipo em 01 de fevereiro de 2017. De imediato, cortou-se a parte central da folha e fixou em solução FAA50 (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50%; 1:1:9, v/v) por 48 horas e, posteriormente conservou-se em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Amostras foliares com aproximadamente um cm² foram diafanizadas em solução de hidróxido de sódio a 10%, clarificadas em solução de hipoclorito de sódio a 50% e lavadas em água destilada (SHOBE e LERSTEN, 1967), em seguida submetidas ao processo de coloração com solução de safranina a 1% e montadas em lâminas temporárias com água (MELO et al., 2007).

Num total de cinco lâminas por genótipo foram observadas e fotografadas em microscópio óptico (Motic BA210, equipado com uma câmera Motic Cam 3[®] 3.0 MP e software Motic Images Plus 2.0), de cada lâmina foi feita imagem de 10 pontos distintos na face abaxial. Posteriormente 15 fotos de cada genótipo foram analisadas através do programa

Anati Quanti (AGUIAR et al., 2007), onde fez-se a contagem de número de células epidérmicas, número de estômatos e aferiu o diâmetro polar e diâmetro equatorial. Logo as características avaliadas foram: CE (número de células epidérmicas por mm^2); NE (número de estômatos por mm^2); DP (diâmetro polar em μm); DQ (diâmetro equatorial em μm), e a partir dessas variáveis foi estimado: DE (densidade estomática - número de estômatos por unidade de área foliar); IAE (índice de área estomática - DP x DQ); IE (índice estomático – relação percentual entre o NE e somatório de número de células epidérmicas com NE) e a FUN (funcionalidade estomática – relação DP/DQ) conforme Castro et al. (2009).

A altura de planta dos 43 genótipos foi feita medindo desde a base até o topo com auxílio de uma trena. Também foi realizada a contagem do número de nós em ramos plagiotrópicos produtivos e aferido respectivo comprimento, fazendo a divisão e determinando a distância entre nós, estas medições foram feitas em seis plantas por tratamento. Para determinação da área foliar coletou-se folhas do terceiro e/ou quarto par recém-desenvolvidas de ramos plagiotrópicos situados no terço médio das plantas, num total de 15 folhas por genótipo. As folhas foram acondicionadas em sacos devidamente identificados e encaminhadas ao laboratório onde foi feita a determinação da área foliar (AF) em cm^2 por meio do medidor de área foliar Modelo LI-3100.

Realizou-se previamente uma análise de variância multivariada (MANOVA) para detectar diferenças entre os tratamentos. A partir dos componentes de variância, foram estimados para cada característica os seguintes parâmetros: coeficiente de variação ambiental (CV_e); coeficiente de variação genético (CV_g); índice de variação (IV) que corresponde a razão CV_g e CV_e , e a herdabilidade (h^2). Para o estudo da divergência genética procedeu-se com o teste de Multicolinearidade com as variáveis independentes, sendo estas: CE, NE, DP e DQ, visto que o valor de NC estava abaixo de 100, considerado como grau de multicolinearidade fraco (MONTGOMERY e PECK, 1981), seguiu com o estudo. Estabeleceu como medida de dissimilaridade a matriz de distância generalizada de Mahalanobis (D^2) e realizou-se o agrupamento dos genótipos pelo método hierárquico *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA). Para estabelecer um ponto de corte no dendrograma e definir o número de grupos foi utilizado o procedimento de Mojena (1977), baseado no tamanho relativo dos níveis de fusões (distâncias) no dendrograma.

Todas as características estomáticas iniciais foram submetidas à análise de correlação de Pearson objetivando efetuar as correlações lineares simples para as combinações, duas a duas. Realizou-se a análise por componentes principais em um gráfico de dispersão Biplot

com todas as características estomáticas e outro adicionando as características biométricas das plantas (altura de planta, área foliar e distância entrenós). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R (R Core Team, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar as imagens pelo programa Anati Quanti constatou-se que as folhas dos cafeeiros avaliados apresentam estômatos somente na parte abaxial, ou seja, na parte inferior. Resultados semelhantes foram constatados por Ramalho et al. (2013) que verificou que as plantas de café continham estômatos apenas na superfície abaxial da folha.

Por meio da análise de variância constataram-se diferenças significativas pelo teste F a 1% de probabilidade entre os 43 genótipos de *C. canephora* para todas as características anatômicas aferidas (Tabela 1). Similarmente, César et al. (2010) relatou diferenças no número de estômatos ao avaliar três cultivares de *C. arabica*. Este resultado evidencia a heterogeneidade na constituição genética da população estudada, logo se pode relatar que são aptos a serem aderidos em programas de melhoramento, uma vez que a existência de variabilidade genética é ferramenta essencial para realizar tais procedimentos (GUEDES et al., 2013; DALCOMO et al., 2015; GILES et al., 2018, 2019).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para características anatômicas foliares avaliadas em 43 genótipos de *Coffea canephora* e respectivos parâmetros genéticos.

Variáveis	QM		Média	CV _e (%)	CV _g (%)	IV	h ² (%)
	Genótipo	Resíduo					
CE	1169,20**	82,21	102,56	8,84	8,29	0,93	92,96
NE	239,729**	11,37	31,05	10,85	12,55	1,15	95,25
IE	47,14**	4,796	23,24	9,42	7,22	0,76	89,82
DE	21575,6**	1670,83	282,24	14,48	12,89	0,89	92,25
IAE	21322,2**	1336,83	435,16	8,40	8,38	0,99	93,73
DP	24,47**	1,548	25,72	4,83	4,80	0,99	93,67
DQ	8,03**	0,768	16,87	5,19	4,12	0,79	90,43
FUN	0,39**	0,007	1,52	5,68	3,03	0,53	81,05

** Significativo a 1% pelo teste F; CV_e: Coeficiente de variação ambiental; CV_g: Coeficiente de variação genético; IV: Índice de variação (CV_g/CV_e); h²: Herdabilidade; CE: Células epidérmicas; NE: Número de estômatos; IE: Índice estomático (%); DE: Densidade estomática (unid. mm⁻²); IAE: Índice de área estomática (µm²); DP: Diâmetro polar (µm); DQ: Diâmetro equatorial (µm); FUN: Funcionalidade estomática.

Dentre os parâmetros genético estimados, o coeficiente de variação ambiental (CV_e) e coeficiente de variação genético (CV_g) apresentaram valores de 4,83 a 14,48% e 3,03 a 12,89%, respectivamente. De acordo com Pimentel Gomes (1985) estes valores são

classificados como baixos e médios, pois se considera baixo quando $<10\%$; médio, entre 10 e 20%; alto, entre 20 e 30%; e muito alto, quando superior a 30%.

O CV% constituiu-se numa estimativa do erro experimental em relação à média geral do ensaio. Considera-se que, quanto menor a estimativa do CV% maior será a precisão do experimento e, quanto maior a precisão, maior a qualidade experimental e menores diferenças entre estimativas de médias serão significativas, e vice-versa (CARGNELUTTI FILHO e STORCK, 2009). Logo, os valores obtidos se mantiveram em níveis aceitáveis para a experimentação de campo, indicando boa acurácia e maior precisão experimental para as características em questão (FERRÃO et al., 2008; FRITSCHÉ-NETO et al., 2012; COUTO et al., 2013).

Em específico o CV_e estima o quanto o ambiente influência na expressão das características avaliadas. Os valores encontrados variaram de a 4,83% para DP a 14,48% para DE, a variável NE também apresentou valor acima de 10, as demais se concentram na faixa de baixo erro experimental com valores menores que 10%. Já o CV_g quantifica a influência dos componentes genéticos para cada característica, este variou de 3,03% para a Fun a 12,89% para DE, mas a maioria se manteve $<10\%$, exceto para NE (12,55%). De acordo com Ferrão et al. (2008) o coeficiente de variação genético é um parâmetro importante que permite inferir sobre a magnitude da variabilidade presente na população, possibilitando comparar os níveis de variabilidade genética presente em diferentes genótipos, ambientes e caracteres. Quanto maior o seu valor, mais heterogêneos são os genótipos avaliados (RODRIGUES et al., 2012; VALADARES et al., 2017).

Os valores de Índice de variação (CV_g/CV_e) alteram de 0,53 para FUN a 1,15 para NE, entretanto, a maioria ficou próximo de 1 e pode ser considerado como um importante parâmetro a ser utilizado na seleção de genótipos superiores, uma vez que Ferrão et al. (2008) obtiveram parâmetros com valores de IV na faixa de 0,70 a 2,00 e os definiu como úteis para programas de melhoramento. Em suma, este é um importante indicador das possibilidades de sucesso na obtenção de ganhos genéticos por meio de seleção, sendo favorável quando os valores são maiores que a unidade, o que confirma que a variação genética supera a ambiental. Assim, CV_g/CV_e permite identificar os caracteres cuja variação se deve mais a causas genéticas do que ambientais. Segundo Vencovsky (1978), valores de b iguais ou acima da unidade significam populações favoráveis para o melhoramento genético.

Os valores de herdabilidade (h^2) foram altos e satisfatórios, entre 81,05 e 95,25%, sendo que seis das oito características avaliadas apresentaram estimativas acima dos 90%. Valores de h^2 elevados significam maiores chances de ganhos genéticos nos procedimentos de

seleção, além de auxiliar na escolha do método mais adequado a ser utilizado (RUFINO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012), logo recomenda-se que trabalhe com valores acima de 80% para obter sucesso nos resultados. A herdabilidade elevada está associada com uma maior variância genética aditiva, menor variação ambiental e menor interação genótipo ambiente (FEHR, 1987; CARIAS et al., 2014).

O agrupamento dos genótipos foi realizado pelo método hierárquico UPGMA, utilizando como medida de dissimilaridade genética a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), adotando o critério de que a média das medidas da divergência genética dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos (CRUZ et al., 2004). Para efetuar este método utilizou somente as variáveis CE, NE, DP e DQ, descartando as variáveis altamente correlacionadas, pois caracteres redundantes, por estarem correlacionados a outros são dispensáveis em estudos de divergência genética (JOLLIFFE, 1972; 1973). Devem ser conservados na análise apenas os caracteres que representam a estrutura fundamental do sistema biológico estudado, desde que suficientemente diversos para representar, no mínimo, as dimensões mais importantes.

Houve a formação de seis grupos pelo método aglomerativo UPGMA quanto às características anatômicas, com corte realizado a 50% segundo Mojema (1977) (Figura 1). Estudo de Batista et al. (2010) evidenciou diferenças entre 15 cultivares de *C. arabica* para as características anatômicas. Estudos de Guedes et al. (2013), com 12 acessos do Germoplasma Maragogipe encontrou 7 grupos distintos através do método UPGMA. Já Ivoglo et al. (2008) obteve 9 grupos distintos quando avaliou 21 progênies de meio-irmãos de *C. canephora*. Giles et al. (2019) avaliando as características morfo-anatômicas de 34 genótipos de *C. canephora* obteve a formação de 7 grupos com corte a 33%.

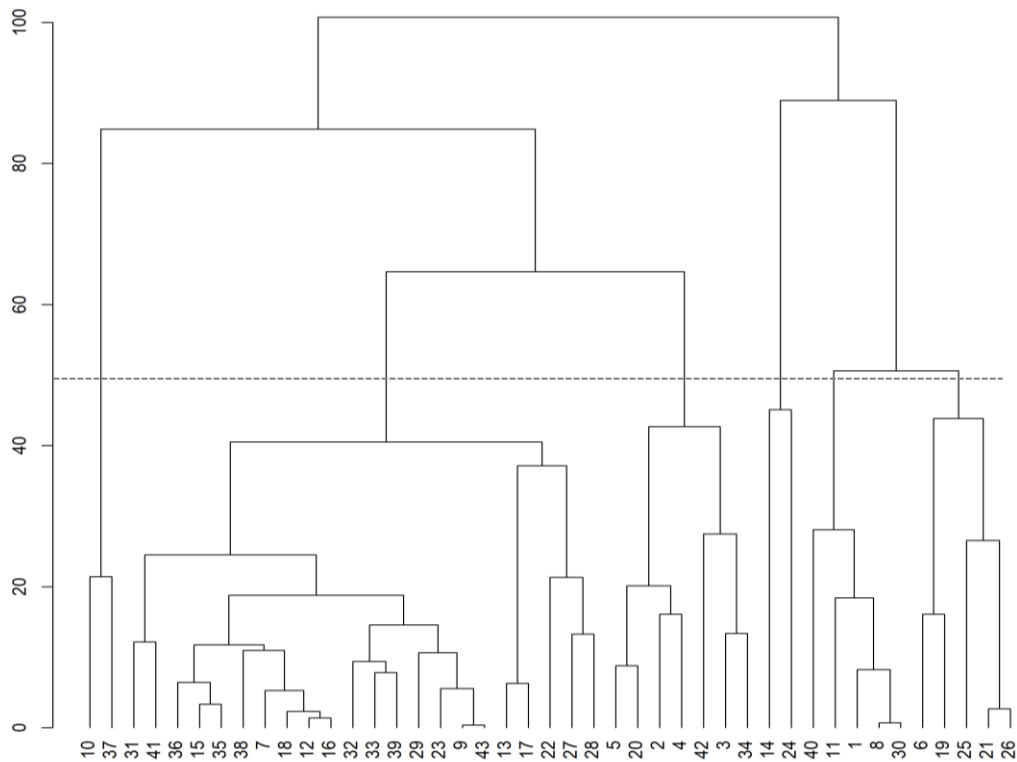


Figura 1. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre 43 genótipos de *Coffea canephora*, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando a distância generalizada de Mahalanobis (D^2) e ponto de corte a 50%, considerando quatro características anatômicas foliares (CE, NE, DP e DQ).

Para melhor visualização e discussão das possíveis diferenças que levaram a formação dos grupos pelo método de agrupamento UPGMA, foi calculado o valor médio por grupo das características: número de células epidérmicas (CE), número de estômatos (NE), diâmetro polar (DP) e diâmetro equatorial (DQ) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias das características anatômicas foliares de *Coffea canephora* por grupo formado pelo método UPGMA.

Grupos	Cél. Epidérmicas	Nº estômatos	Diâm. Polar	Diâm. Equatorial
	mm ²		µm	
1	86,03	26,63	27,94	16,84
2	99,46	28,89	26,09	17,22
3	106,30	29,96	23,92	15,90
4	97,00	34,73	28,02	17,75
5	104,68	35,01	25,39	16,45
6	117,78	38,46	25,14	16,74

Os parâmetros morfológicos dos estômatos, como tamanho, forma, frequência e distribuição são específicos de cada espécie, mas mudam imensamente entre os diferentes genótipos de um mesmo ambiente, evidenciando a capacidade que as plantas possuem de se

ajustar em detrimento às pressões ambientais (CÉSAR et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA e MIGLIORANZA, 2014; OLIVEIRA, MIGLIORANZA e ALMEIDA, 2016).

O primeiro grupo foi composto apenas pelos genótipos 10 e 37. Estes se diferenciam dos demais por apresentarem reduzido número de células epidérmicas e estômatos, porém, possuem o segundo maior diâmetro polar. Ou seja, contém menor número de estômatos por área, mas com tamanho grande e forma elíptica. A relação entre os DP e DQ se constitui como um bom indicativo do formato dos estômatos, visto que quanto maior esta relação, a forma estomática é mais elipsóide, conferindo maior funcionalidade, e quanto menor esta relação, o estômato é menos elipsóide/mais esférico, diminuindo sua funcionalidade (GRISI et al., 2008; CASTRO et al., 2009; BATISTA et al., 2010; BALIZA et al., 2012). Os estômatos mais elípticos permitem uma menor transpiração da folha, aumentando a funcionalidade deste (BATISTA et al., 2010).

O segundo grupo se caracteriza como o maior, abrangendo 22 genótipos, ou seja, 51,1% do total de material de estudo, sendo estes: 31, 41, 36, 15, 35, 38, 7, 18, 12, 16, 32, 33, 39, 29, 23, 9, 43, 13, 17, 22, 27 e 28. De modo geral, apresentam valores médios de 99,46 células epidérmicas, 28,89 estômatos, 26,09 μm de diâmetro polar e 16,84 μm de diâmetro equatorial, bem parecidos à constituição do primeiro grupo.

O terceiro grupo foi formado por sete genótipos, sendo estes 5, 20, 2, 4, 42, 3 e 34. As características que mais os distinguem dos demais é que possuem o menor diâmetro polar e equatorial, ou seja, os estômatos de menor tamanho. A redução no tamanho dos estômatos é um evento reconhecidamente importante na regulação das trocas gasosa, uma vez que folhas com estômatos menores tendem a apresentar maior eficiência de uso da água e a diferença no tamanho da abertura estomática exibe maior efeito sobre a difusão de água do que sobre a difusão de CO_2 (GRISI et al., 2008; OLIVEIRA e MIGLIORANZA, 2013; MELO et al., 2017).

O quarto grupo contém apenas os genótipo 14 e 24 que apresentam a maior média de diâmetro polar e diâmetro equatorial e o terceiro maior número de estômatos, ou seja, são detentores dos maiores estômatos. Em certas condições ambientais estômatos muito grandes nem sempre são favoráveis, uma vez que no processo de abertura pode ocorrer maior taxa de transpiração, logo em condições de déficit hídrico se caracteriza como um fator limitante caso a planta não tenha a capacidade de ajustar (QUEIROZ-VOLTAN et al., 2015). Variações no comportamento estomático, nomeadamente o seu tamanho, ocorrem em função do ambiente, da constituição genética da espécie e frequentemente em plantas submetidas a diferentes estresses (OLIVEIRA e MIGLIORANZA, 2014; 2016).

O quinto grupo é formado pelos genótipos 40, 11, 1, 8, 30 que trazem em sua constituição número elevado de células epidérmicas e estômatos, assim como o sexto grupo composto pelos genótipos 6, 19, 25, 21 e 26 que apresentam os maiores valores de células epidérmicas e estômatos, e ainda detém o menor diâmetro polar. Vale relatar que os genótipos que compõe estes grupos apresentam altos valores de densidade estomática, com média de 352 estômatos por mm², em função do elevado número de células epidérmicas e estômatos, fato que deve ser levado em consideração diante da importância desse parâmetro para eficiência no processo fotossintético da planta.

O aumento na densidade estomática pode estar relacionado com uma maior habilidade em captar o CO₂ da atmosfera, melhorando a eficiência fotossintética (CASTRO et al., 2009; BATISTA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014), pois, maior densidade pode condicionar abertura estomática em um espaço de tempo mais curto, com uma captação adequada de CO₂, reduzindo o tempo em que os estômatos ficam abertos, diminuindo assim a transpiração, conferindo uma melhor adaptação das plantas às condições de escassa disponibilidade de água (OLIVEIRA e MIGLIORANZA, 2013; 2014). A densidade estomática é um importante parâmetro ecofisiológico que afeta diretamente as trocas gasosas e a fotossíntese (CAMARGO e MARENCO, 2011). Normalmente genótipos com resistência a estresse hídrico possuem maior densidade estomática (GRISI et al., 2008; BATISTA et al., 2010; QUEIROZ-VOLTAN et al., 2015; GAMA et al., 2017).

Diante desses resultados é perceptível a diversidade genética dos 43 genótipos estudados, por exemplo, o primeiro e o sexto grupo apresentam grandes diferenças em número de células epidérmicas, número de estômatos, diâmetro polar e equatorial. Desse modo, esses genótipos reunidos em grupos mais distantes, exibiram maior dissimilaridade entre si, podem ser considerados como promissores em futuros cruzamentos artificiais. Vale acrescentar que para confirmar e assegurar as possíveis comparações feitas entre as características é necessário à realização de um trabalho mais aprofundado, com avaliações de trocas gasosas por exemplo.

As oito variáveis estomáticas foram correlacionadas, observou valores positivos e negativos, com distintos níveis de significância (Figura 2). O estudo da correlação fornece a informação de que traços fortes são geneticamente associados uns aos outros (BIKILA e SAKIYAMA, 2017).

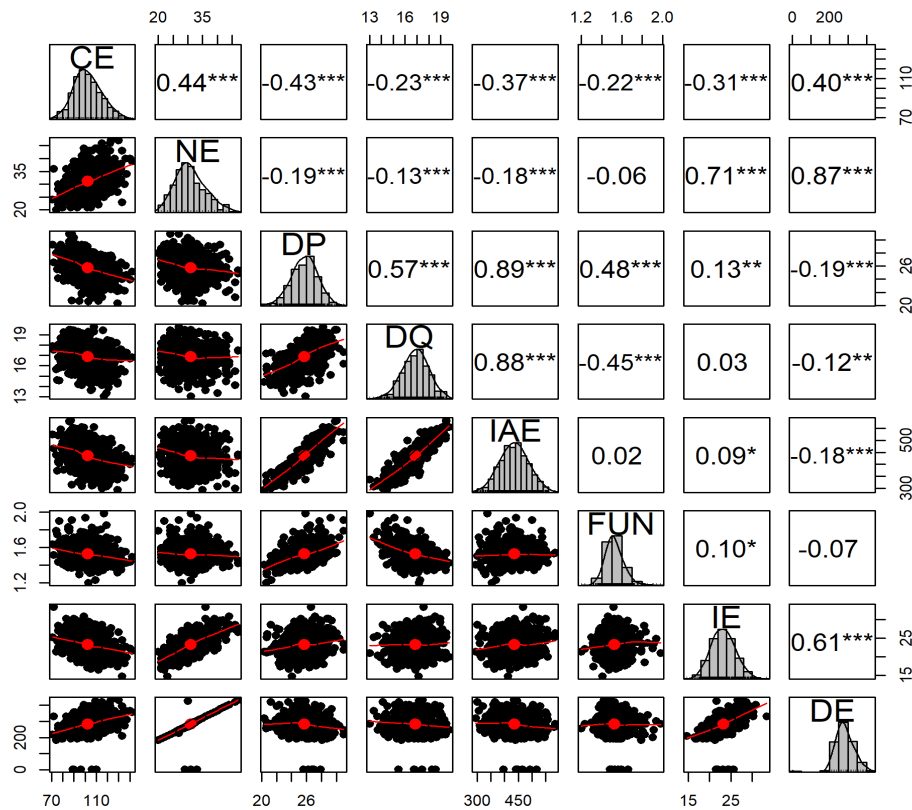


Figura 2: Correlação entre oito características anatômicas foliares (CE: Células epidérmicas; NE: Número de estômatos; DP: Diâmetro polar; DQ: Diâmetro equatorial; IAE: Índice de área estomática; Fun: Funcionalidade; IE: Índice estomático; DE: Densidade estomática) de 43 genótipos de *Coffea canephora*. (*, ** e *** correspondem a significância de $p < .05$, $p < .01$ e $p < .001$, respectivamente).

No total foram estimadas 28 correlações, destas 42% foram classificadas como “bem fracas”, que variam de 0,00 a 0,19 de acordo com classificação de Devore (2006). Embora tenha expressado valores baixos, foram significativas, representadas pela NE x DQ (-0,13***), NE x IAE (-0,18***), DP x IE (0,13**), DP x DE (-0,19***), DQ x DE (-0,12**), IAE x IE (0,09*), Fun X IE (0,10*). Algumas correlações foram negativas, isso significa que o incremento de uma variável pode diminuir a expressão da outra ou a diminuição de uma variável ocasiona o aumento da outra (CABRAL et al., 2016). Assim, o número de estômatos interfere no diâmetro equatorial e no índice de área estomático; já o diâmetro polar e equatorial interfere na densidade estomática; e o índice de área estomática afeta a funcionalidade. As correlações positivas expõem que o aumento do diâmetro polar, índice de área específica e funcionalidade incrementam o índice estomático.

As correlações classificadas na modalidade “fraca”, que compreende os valores entre 0,20 a 0,39 (Devore, 2006), abrangeram 14,28% do total, sendo estas: CE x DQ (-0,23***),

CE x IAE (-0,37***), CE x Fun (-0,22***) e CE x IE (-0,31***). Interessante observar que todas as correlações foram negativas e envolvem o número de células epidérmicas, logo, maior número de células epidérmicas pode afetar o diâmetro equatorial, índice de área específica, a funcionalidade e o índice estomático.

Correlações positivas e negativas classificadas como “moderada” (0,40 a 0,69 Devore, 2006) correspondeu a 25% do total, sendo estas: CE x NE (0,44***), CE x DP (-0,43***), CE x DE (0,40***), DP x Fun (0,48***), DQ x Fun (-0,45***), IE x DE (0,61***). Logo, células epidérmicas têm correlação positiva com NE e DE, e negativa com DP, já o IE correlaciona positivamente com DE. A funcionalidade tem correlação positiva e negativa com DP e DQ, respectivamente, este comportamento ocorre, pois esta variável é determinada pela relação DP/DQ. Correlação negativa entre DQ e Fun também foram observadas por Oliveira e Miglioranza (2013) em folhas de mandioca.

Correlações fortes e positivas dispostas na faixa de 0,70 a 0,89 (Devore, 2006), corresponderam a 14,28% do total, especificamente NE x IE (0,71***), NE x DE (0,87***), DP x IAE (0,89***) e DQ x IAE (0,88***), variando de 0,71 a 0,89. Estes resultados são consistentes e confiáveis, pois o índice estomático e a densidade estomática são estimados a partir do número de estômatos.

A fim de complementar os resultados das correlações entre as variáveis anatômicas foliares, procedeu-se com a análise por componentes principais em gráficos Biplot (Figura 3). Análise de componentes principais mostrou que os dois primeiros componentes PC1 e PC2 explicaram 75,7% da variação total (Figura 3). Cruz et al. (2011) relatam que o ideal é que os dois primeiros componentes principais concentrem a maior quantidade de variância dos dados para que haja divergência entre grupos de genótipos. No Biplot, as variáveis são representadas por vetores e os genótipos por números. Quanto maior o vetor, maior a influência da variável no agrupamento, e quanto menor o ângulo entre os vetores, maior a correlação entre as variáveis.

Com base na projeção dos genótipos no plano cartesiano definido pelos dois componentes principais, verifica-se dispersão dos mesmos, indicando considerável divergência quanto às características avaliadas. Observando o PC1, nota-se que os genótipos 13 e 19 apresentaram maiores distância. Tal comportamento ocorre certamente, pois o genótipo 19 contém número de estômatos elevado (39,13), menor diâmetro polar e equatorial, 23,5 e 15,4 μm , respectivamente. O genótipo 13 apresenta menor número de estômatos (24,8), maior diâmetro polar (27,8 μm) e maior diâmetro equatorial (18,21 μm).

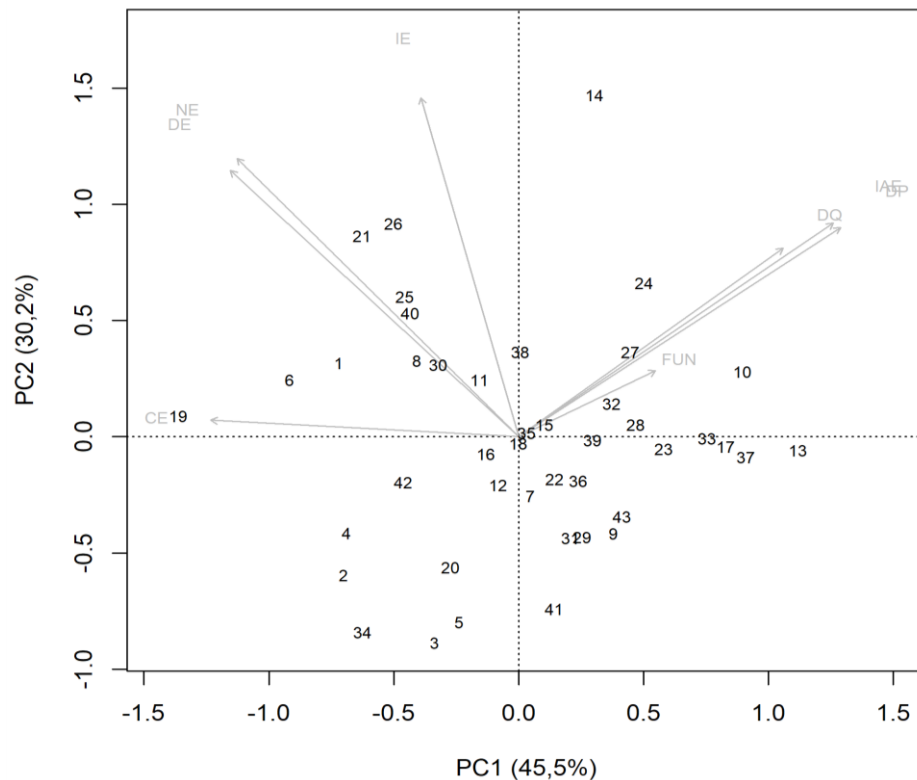


Figura 3: Análise por componentes principais para as oito variáveis anatômicas foliares de 43 genótipos de *Coffea canephora*. (CE: Células epidérmicas; NE: Número de estômatos; DP: Diâmetro polar; DQ: Diâmetro equatorial; IAE: Índice de área estomática; Fun: Funcionalidade; IE: Índice estomático; DE: Densidade estomática).

No PC2 maior distância é vista entre os genótipos três e 14. O primeiro trás menor diâmetro polar (23,66 μm), já o genótipo 14 apresenta elevado número de estômatos (37,4), maior diâmetro polar (28 μm) e equatorial (18,25 μm). Logo, demais genótipos que se encontram próximo aos referidos devem apresentar características similares.

Observa-se a concentração de células epidérmicas (CE), densidade estomática (DE), número de estômatos (NE) e índice estomático (IE) em PC1 negativo e PC2 positivo. Logo, fica claro que DE e NE possuem alto grau de relação, devido à proximidade no posicionamento entre elas, já CE e IE se mantêm mais distante quase formando ângulo de 90° , evidenciando menor grau de correlação. No PC1 e PC2 positivos encontram-se dispostas a funcionalidade, diâmetro polar, diâmetro equatorial e índice de área estomático, nota-se que as últimas três se posicionam muito próximas, evidenciando a grande relação existente entre estas, uma vez que as estimativas de Fun e IAE são feitas a partir das medidas lineares dos estômatos.

Além das oito variáveis anatômicas foliares, num segundo gráfico Biplot foram acrescentadas mais três variáveis biométricas da planta, sendo estas: altura de planta (Alt),

distância entrenós (DistEntrenó) e área foliar (AF), com intuito de observar se há alguma relação entre as características anatômicas e biométricas da planta (Figura 4).

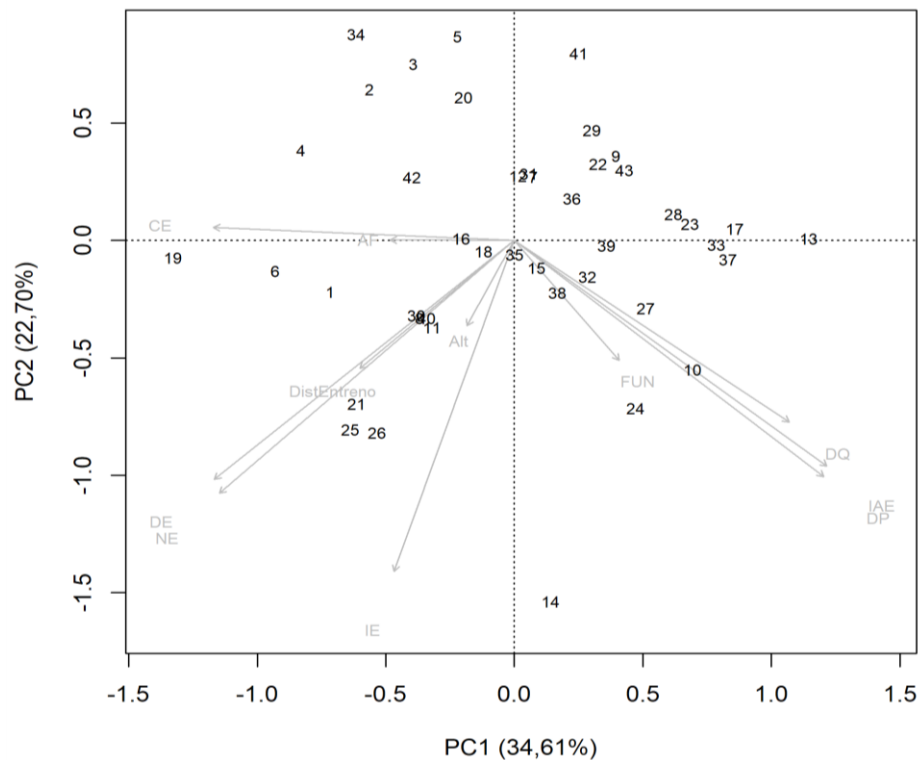


Figura 4. Análise por componentes principais com oito variáveis anatômicas foliares e três características biométricas da planta de 43 genótipos de *Coffea canephora*. (CE: Células epidérmicas; NE: Número de estômatos; DP: Diâmetro polar; DQ: Diâmetro equatorial; IAE: Índice de área estomática; Fun: Funcionalidade; IE: Índice estomático; DE: Densidade estomática; Alt: altura de planta; DistEntrenó: distância entrenós e AF: área foliar).

Análise de componentes principais mostrou que os dois componentes PC1 e PC2 explicaram 57,31% da variação total (Figura 4). Ao acrescentar as variáveis biométricas da planta nota-se que há correlação com as variáveis anatômicas e se encaixam no quadrante que corresponde ao PC1 negativo e PC2 negativo juntamente com DE, NE e IE. A área foliar ficou muito próxima ao número de células epidérmicas; distância entrenós se manteve junto com densidade estomática e número de estômatos; altura de planta situou-se entre índice estomático, número de estômatos e densidade estomática.

Camargo e Marenco (2011) observaram relação positiva entre aumento de densidade estomática com o aumento de altura arbórea, quando examinou características anatômicas de 35 espécies de árvores na Amazônia Central. Entretanto, ressaltaram que a equação de regressão poderia explicar apenas 14% da variância na densidade estomática, logo há outros fatores que agem na determinação da densidade estomática.

Diante dos resultados obtidos com essa pesquisa reforçamos que a diversidade genética é um pré-requisito para o melhoramento de culturas agrícolas. Contudo, o uso/exploração adequada da diversidade genética dentre as coleções de materiais disponíveis necessita de um bom conhecimento prévio de suas características. Além disso, caracterização da diversidade regional de uma cultura é importante para a compreensão e direção da seleção e a melhoria específica do local requerido. A caracterização de acessos é tradicionalmente realizada com base em características morfológicas e agronômicas, logo o presente estudo demonstrou potencial, atingindo os objetivos propostos.

CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética entre os 43 genótipos de *C. canephora*;

O método de agrupamento UPGMA distinguiu os materiais em seis grupos;

Os genótipos 10 e 37 apresentam maior dissimilaridade em comparação aos demais;

As características estomáticas possuem diferentes graus de correlação entre si, sendo os maiores entre NE x IE e DE; DP e DQ x IAE;

Altura de planta, área foliar e distância entrenós podem se correlacionar com características estomáticas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; AZEVEDO, A.A.; FERREIRA, R.S. ANATI QUANTI: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. *Planta Daninha*, v. 25, n. 4, p. 649-659, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582007000400001>.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- BATISTA, L.A.; GUIMARÃES, R.J.; PEREIRA, F.J.; CARVALHO, G.R.; CASTRO, E.M.D. Anatomia foliar e potencial hídrico na tolerância de cultivares de café ao estresse hídrico. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 3, p. 475-481, 2010.
- BALIZA, D.P.; CUNHA, R.L.; CASTRO, E.M.; BARBOSA, J.P.R.A.D.; PIRES, M.F.; GOMES, R.A. Trocas gasosas e características estruturais adaptativas de cafeeiros cultivados em diferentes níveis de radiação. *Coffee Science*, v. 7, n. 3, p. 250-258, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v7i3.347>.
- BIKILA, B.A.; SAKIYAMA, N.S. Estimation of Genetic Parameters in *Coffea canephora* Var. Robusta. *Advances in Crop Science and Technology*. v. 5, n. 5, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-8863.1000310>.
- BRAGANÇA, S.M.; CARVALHO, C.H.S.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G. Variedades clonais de café Conilon lançadas para o estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária*

- Brasileira, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2001000500006>.
- CABRAL, P.D.S.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; FREITAS, I.L.J.; RIBEIRO, R.M.; SILVA, T.R.C.; Relação causa e efeito de caracteres quantitativos sobre a capacidade de expansão do grão em milho-pipoca. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 1, p. 108-117, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160013>.
- CAMARGO, M.A.B.; MARENCO, R.A. Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia. *Acta Amazônica*, v. 41, n. 2, p. 205- 212, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672011000200004>.
- CARGNELUTTI FILHO, A., STORCK, L. Measures of experimental precision degree in corn cultivar competition trials. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 2, p. 111-117, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000200001>.
- CARIAS, C.M.O.M.; TOMAZ, M.T.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G.; GONÇALVES, L.S.A. Produtividade de grãos de cafeeiro conilon de diferentes grupos de maturação pelo procedimento REML/BLUP. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 2, p. 707-718, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n2p707>.
- CARMONA, P.A.O.; PEIXOTO, J.R.; AMARO, G.B.; MENDONÇA, M.A. Divergência genética entre acessos de batata-doce utilizando descritores morfoagronômicos das raízes. *Horticultura Brasileira*, v. 33, n. 2, p. 241-250, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000200017>.
- CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.J.; PAIVA, R. *Histologia Vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos*. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- CÉSAR, F.R.C.F.; MATSUMOTO, S.N.; VIANA, A.E.S.; SANTOS, M.A.F.; BONFIM, J.A. Morfofisiologia foliar de cafeeiro sob diferentes níveis de restrição luminosa. *Coffee Science*, v. 5, n. 3, p. 262-271, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v5i3.132>.
- CHENG, B.; FURTADO, A.; SMYTH, H.E.; HENRY, R.J. Influence of genotype and environment on coffee quality. *Trends in Food Science & Technology*. v. 57, p. 20-30, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.003>.
- CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia*, v. 20, n. 1, p. 787-804, 1961.
- COUTO, M.F., PETERNELLI, L.A., BARBOSA, M.H.P. Classification of the coefficients of variation for sugarcane crops. *Ciência Rural*, v. 43, n. 6, p. 957-961, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013000600003>.
- CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*. Minas Gerais: Suprema Gráfica Editora; 2011. 620 p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. *Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético*. 4. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2012. 514p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. *Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético*. 3.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2004. v. 1, 480p.
- DALCOMO, J.M.; VIEIRA, H.D.; FERREIRA, A.; LIMA, W.L.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G.; PARTELLI, F.L. Evaluation of genetic divergence among clones of conilon coffee after scheduled cycle pruning. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 4, p. 15417-15426, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015>.

- DALCOMO, J.M., VIEIRA, H.D., FERREIRA, A.; PARTELLI, F.L. Growth comparison of 22 genotypes of conilon coffee after regular pruning cycle. *African Journal of Agricultural Research*, v. 12, n. 1, p. 63-70, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11261>.
- DAMATTA, F. M. Coffee tree growth and environmental acclimation. Chapter taken from: Lashermes, P. (ed.), *Achieving sustainable cultivation of coffee*, Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, 2018 (ISBN: 978 1 78676 152 1; www.bdspublishing.com). DOI: <http://dx.doi.org/10.19103/AS.2017.0022.02>.
- DAMATTA, F.M.; GODOY, A.G.; MENEZES-SILVA, P.E.; MARTINS, S.C.V.; SANGLARD, L.M.V.P.; MORAIS, L.E.; TORRE-NETO, A.; GHINI, R. Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of Experimental Botany*, v. 67, p. 341-352, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv463>.
- DENOEUDE, F.; CARRETERO-PAULET, L.; DEREPPER, A.; DROC, G.; GUYOT, R.; PIETRELLA, M.; ZHENG, C.; ALBERTI, A.; ANTHONY, F.; APREA, G., et al. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, v. 345, p. 1181-1184, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1255274>.
- DITTBERNER, H.; KORTE, A.; METTLER-ALTMANN, T.; WEBER, A.; MONROE, G.; de MEAUX, J. Natural variation in stomata size contributes to the local adaptation of water-use efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *bioRxiv* 253021; DOI: <https://doi.org/10.1101/253021>.
- DEVORE, J.L. Probabilidade e estatística: para engenharia e ciências. São Paulo, SP: Thomson Pioneira, 2006. 706 p.
- FEHR, W. R. Principles of cultivars development. New York: Macmillan, 1987. 536 p.
- FERRÃO, R.G.; CRUZ, C.D.; FERREIRA, A.; CECON, P.R.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.F.; CARNEIRO, P.C.S.; SILVA, M.F. Parâmetros genéticos em café Conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-69, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000100009>.
- FRITSCHÉ-NETO, R.; VIEIRA, R.A.; SCAPIM, C.A.; MIRANDA, G.V.; REZENDE, L. M. Updating the ranking of the coefficients of variation from maize experiments. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 34, n. 1, p. 99-101, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v34i1.13115>.
- GABRIEL, K.R. The Biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*, 58: p. 453-467, 1971.
- GAMA, T.C.P.; SALES JUNIOR, J.C.; CASTANHEIRA, D.T.; SILVEIRA, H.R.O.; AZEVEDO, H.P.A. Anatomia foliar, fisiologia e produtividade de cafeeiros em diferentes níveis de adubação. *Coffee Science*, v. 12, n. 1, p. 42-48, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v12i1.1195>.
- GILES, J.A.D.; PARTELLI, F.L.; FERREIRA, A.; RODRIGUES, J.P.; OLIOSI, G.; LIMA, F.H. Genetic diversity of promising conilon coffee clones based on morpho-agronomic variables. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 2, p. 2437-2446, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170523>.
- GILES, J.A.D.; FERREIRA, A.D.; PARTELLI, F.L.; AOYAMA, E.M.; RAMALHO, J.C.; FERREIRA, A.; FALQUETO, A.R. Divergence and genetic parameters between *Coffea* sp.

- genotypes based in foliar morpho-anatomical traits. *Scientia horticulturae*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.038>.
- GRISI, F.A.; ALVES, J.D.; CASTRO, E.M.; OLIVEIRA, C.; BIAGIOTTI, G.; MELO, L. A. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café ‘Catuai’ e ‘Siriema’ submetidas ao estresse hídrico. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000600008>.
- GUEDES, J.M.; VILELA, D.J.M.; REZENDE, J.C.; SILVA, F.L.; BOTELHO, C.E.; CARVALHO, S.P. Divergência genética entre cafeeiros do germoplasma Maragogipe. *Bragantia*, v. 72, n. 2, p. 127-132, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052013000200003>.
- IVOGLO, M.G.; FAZUOLI, L.C.; OLIVEIRA, A.C.B.; GALLO, P.B.; MISTRO, J.C.; SILVAROLLA, M.B.; TOMA-BRAGHINI, M. Divergência genética entre progênies de café robusta. *Bragantia*, v. 67, n. 4, p. 823-831, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000400003>.
- JOHANSEN, B. A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.
- JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis; I Artificial data. *Applied Statistics*. v. 22, p. 160-173. 1972.
- JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis; II Real data. *Applied Statistics*. v. 22, p. 21-31. 1973.
- LIMA FILHO, T.; DELLA LUCIA, S.M.; SARAIVA, S.H.; CARNEIRO, J.C.S.; ROBERTO, C.D. Perfil sensorial e aceitabilidade de bebidas de café tipo expresso preparadas a partir de *blends* de café arábica e conilon. *Enciclopédia Biosfera*, v. 7, n. 12, p. 1-17, 2011.
- LIMA FILHO, T.; DELLA LUCIA, S.M.; SARAIVA, S.H.; LIMA, R.M. Características físico-químicas de bebidas de café tipo expresso preparadas a partir de *blends* de café arábica e conilon. *Revista Ceres*, v. 62, n. 4, p. 333-339, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201562040001>.
- LIPKOVICH, I.; SMITH, E. P. Biplot and Singular Value Decomposition Macros for Excel. *Journal of Statistical Software*. Blacksburg, v. 7, n. 5, p. 1-15, 2002.
- MACHADO, C.M.S.; PIMENTEL, N.S.; GOLYNSK, A.; FERREIRA, A.; VIEIRA, H.D.; PARTELLI, F.L. Genetic diversity among 16 genotypes of *Coffea arabica* in the Brazilian cerrado. *Genetics and Molecular Research*, v. 16, n. 3, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039794>.
- MELO, H.C.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M.; MELO, L.A.; ALVES, J.D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea*, v. 34, n. 2, p. 145-153, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062007000200003>.
- MELO, L.A.; MELO, H.C.; DAVIDE, A.C.; CASTRO, E.M.; SANTOS, J.P. Estaquia e efeito da deficiência hídrica ou inundação sobre características morfoanatômicas de *Cestrum axillare* Vell. *Ciência Florestal*, v. 27, n. 1, p. 325-337, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.5902/1980509826471>.
- MOJENA, R. Hierárquical grouping method and stopping rules: an evaluation. *Computer Journal*, v. 20, p. 359-363, 1977.
- MONTGOMERY, D.C.; PECK, E.A. *Introduction to linear regression analysis*. New York: John Wiley, 1981. 504p

- MORAES, M.S.; TEIXEIRA, A.L.; RAMALHO, A.R.; ESPÍNDULA, M.C.; FERRÃO, M. A.G.; ROCHA, R.B. Characterization of gametophytic selfincompatibility of superior clones of *Coffea canephora*. *Genetics and Molecular Research*, v. 17, n. 1, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039876>.
- OLIVEIRA, E.C.D.; MIGLIORANZA, E. Densidade e distribuição estomática em mandioca *Manihot esculenta* Crantz cultivar IAC 576-70. *Scientia Agropecuaria*, v. 5, n. 3, p. 135-140, 2014.
- OLIVEIRA, E.C.D.; MIGLIORANZA, E. Dimensões e densidade estomática em diferentes variedades de mandioca. *Cultivando o saber*, v. 6, n. 4, p. 201-213, 2013.
- OLIVEIRA, E.C.; MIGLIORANZA, E.; ALMEIDA, L.H.C. Frequência estomática entre cultivares de mandioca avaliada por gráficos de caixa. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 12, n. 2, p. 230-236, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v12i2.742>.
- OLIVEIRA, N.K.; CASTRO, E.M.; GUIMARÃES, R.J.; PIEVE, L.M.; BALIZA, D.P.; MACHADO, J.L.; FREITAS, T. Anatomia foliar de cafeeiros implantados com o uso de polímero hidrorretentor. *Coffee Science*, v. 9, n. 2, p. 258-265, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v9i2.631>.
- PARTELLI, F.L.; COVRE, A.M.; OLIVEIRA, M.G.; ALEXANDRE, R.S.; VITÓRIA, E.L.; SILVA, M.B. Root system distribution and yield of 'Conilon' coffee propagated by seeds or cuttings. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 49, n. 5, p. 349-355, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000500004>
- PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; SANTIAGO, A.R.; BARROSO, D.G. Produção e desenvolvimento radicular de plantas de café 'Conilon' propagadas por sementes e por estacas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 6, p. 949-954, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000600008>.
- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. São Paulo: Nobel, 1985. 467 p.
- R Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; NARDIN, C.F.; FAZUOLI, L.C.; BRAGHINI, M.T. Caracterização da anatomia foliar de cafeeiros arábica em diferentes períodos sazonais. *Biotemas*, v. 27, n. 4, p. 1-10, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2014v27n4p1>.
- RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SIMÕES-COSTA, M.C.; LEITÃO, A.E.; FORTUNATO, A.S.; BATISTA-SANTOS, P.; PALOS, I.M.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M. Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. *PLoS ONE*, v. 8, e82712, 2013b. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082712>.
- RODRIGUES, W.N.; TOMAZ, M.A.; FERRÃO, R.G.; FERRÃO, M.A.G FONSECA, A.F.A.; MIRANDA, F.D. Estimativa de parâmetros genéticos de grupos de clones de café conilon. *Coffee Science*, v. 7, n. 2, p. 177-186, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v7i2.308>.
- RUFINO, E.R.; SIQUEIRA, W.J.; MARQUES, M.O.M.; COLOMBO, C.A.; CHIORATO, A.F.; AZEVEDO FILHO, J.A.; LOURENÇÃO, A.L.; YAMAMOTO, P.Y.; MARTINS, A.L.M. Estimativas de parâmetros genéticos de caracteres relacionados ao vigor de estacas em *Lippia alba*. *Bragantia*, v. 69, n. 4, p. 779-786, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052010000400002>.

- SHOBE, W.R.; LERSTEN, N.R. A technique for clearing and staining Gymnosperm leaves. *Botanical Gazette*, v. 128, n. 2, p. 150-152, 1967.
- TEIXEIRA, O.R.; PASSOS, F.R.; MENDES, F.Q. Qualidade físico-química e microscópica de 14 marcas comerciais de café torrado e moído. *Coffee Science*, v. 11, n. 3, p. 395-402, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v11i3.1111>.
- VALADARES, R.N.; MELO, R.A.; SILVA, J.A.S.; ARAÚJO, A.L.R.; SILVA, F.S.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; MENEZES, D. Estimativas de parâmetros genéticos e correlações em acessos de melão do grupo *momordica*. *Horticultura Brasileira*, v. 35, n. 4, p. 557-563, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620170413>.
- VENCOVSKY, R Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E., ed. *Melhoramento e produção de milho no Brasil*. Piracicaba: Fundação Cargill, 1978. p.122-201.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE *Coffea canephora* POR CARACTERES AGRONÔMICOS

RESUMO: A polinização cruzada e autoincompatibilidade gametofítica da espécie *Coffea canephora* ocasiona a origem de diferentes genótipos, assim o estudo das características biométricas torna-se essencial, pois auxiliam na seleção de materiais promissores. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo estudar a divergência genética de 43 genótipos de cafeeiro conilon a partir de caracterização biométrica das plantas e dimensões foliares. Logo, foram estimados: comprimento de ramo plagiotrópico, número de nós em ramos plagiotrópico, distância entre nós plagiotrópico, comprimento de ramo ortotrópico, número de nós em ramos ortotrópico, distância entre nós ortotrópico, altura de planta, diâmetro de copa, comprimento de folha, largura de folha e área foliar em duas avaliações. Os dados foram submetidos à análise multivariada e agrupadas pelo método otimização de Tocher e pelo método hierárquico UPGMA, em seguida foram submetidas à análise de correlação linear de Pearson e componentes principais. Constatou diferença significativa entre os genótipos, os 43 genótipos foram separados em seis grupos pelo método de otimização de Tocher e cinco grupos pelo método UPGMA, evidenciando a variabilidade genética presente entre os materiais. A correlação de Pearson apresentou valores desde bem fracos a muito fortes, positivos e negativos entre as características, comprovados pela análise de componentes principais. Logo, estes resultados ressaltam a importância e necessidade de considerar avaliações biométricas na identificação e seleção de genótipos para compor novas cultivares de café conilon.

PALAVRAS-CHAVE: café conilon, biometria, análise multivariada, agrupamento, seleção.

GENETIC DIVERSITY OF *Coffea canephora* GENOTYPES BY AGRONOMIC CHARACTERS

ABSTRACT: Cross-pollination and gametophytic self-incompatibility of the *Coffea canephora* species causes the origin of the different genotypes, as well as the study of the biometric characteristics becomes essential, since they help in the selection of promising materials. Thus, this work aims to study a genetic divergence of 43 conilon coffee genotypes

from a biological characterization of plants and foliar forms. Therefore, we estimated: length of plagiotropic branch, number of nodes in plagiotropic branches, distance between plagiotropic nodes, length of orthotropic branch, number of nodes in orthotropic branches, orthotropic distance between nodes, plant height, crown diameter, leaf length, leaf width and leaf area in two evaluations. The data were analyzed by multivariate analysis and grouped by the filter optimization method and by the UPGMA hierarchical method, being found in Pearson's linear linear analysis and main components. A significant difference was found between the genotypes, and the genetic groups were separated into six groups by the group and group optimization method using the UPGMA method, evidencing a genetic variability present among the materials. Pearson's correlation began to have a number of positive, positive and negative results among the demonstrations, and was proved by principal component analysis. Therefore, the performance of the companies resuscitated the ability to obtain biometric data in the identification and selection of genotypes to compose new conilon coffee cultivars.

KEY WORDS: conilon coffee, biometrics, multivariate analysis, clustering, selection.

INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de café, sendo a produção dividida entre café arábica (*Coffea arabica* L.) e café Conilon (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) (CONAB, 2018). Dentre as commodities o café é superado apenas pelo petróleo, ou seja, é um dos produtos primários mais valiosos comercializados no mundo, negociado nas principais bolsas de valores, como de Londres e Nova York. Consagra-se como importante fonte de renda para diversos países em desenvolvimento, gerando empregos para milhões de pessoas (BRINATE et al., 2015ab).

O melhoramento genético tem contribuído substancialmente para o desenvolvimento da cafeicultura com perceptíveis avanços alcançados nas últimas décadas (DALCOMO et al., 2015; LIMA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017). Contudo, sempre há demanda de novas cultivares detentoras de características agrônômicas desejadas e com bom desempenho nos mais diversos ambientes. Cultivares produtivas e com atributos adaptados aos vários sistemas de cultivo está entre os principais componentes de competitividade e sustentabilidade da cafeicultura (CARVALHO et al., 2016).

O conhecimento de características morfológicas e biométricas são muito úteis no processo de seleção de cafeeiros (FREITAS et al., 2007; CARVALHO et al., 2010;

NOGUEIRA et al., 2012), por exemplo, altura de plantas, comprimento do ramo plagiotrópico, número de nós e vigor vegetativo são considerados um dos principais caracteres morfológicos responsáveis pela variação na produção de grãos (CARVALHO et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2012; ASSIS et al., 2014; PEREIRA et al., 2016). Além disso, as características foliares devem ser consideradas nos processos de seleção, pois são importantes na avaliação do crescimento e desenvolvimento das plantas, permitindo aferir alguns parâmetros fisiológicos, tais como intensidade de transpiração e taxa assimilatória líquida (FASCELLA et al., 2013; SCHMIDT et al., 2014), logo, tais conhecimentos possibilitam obter informações precoces que normalmente estão correlacionadas com o rendimento da cultura (BRINATE et al., 2015).

Devido à espécie *C. canephora* ser tipicamente alógama, diplóide e portar autoincompatibilidade genética do tipo gametofítica (CONAGIN e MENDES, 1961; TRAN et al., 2017; MORAES et al., 2018), a reprodução natural resulta em uma população altamente diversa quanto à arquitetura, formato e tamanho de grãos e folhas, época e uniformidade de maturação dos frutos, suscetibilidade a pragas e doenças, tolerância a condições estressantes, entre outros. Logo, plantas com essas características não são viáveis para compor uma lavoura comercial, havendo a necessidade da atuação de melhoristas em busca/seleção de materiais mais homogêneos.

Por métodos convencionais o melhoramento genético do cafeeiro demanda mais de 30 anos para obter uma nova cultivar com características agronômicas geneticamente estáveis e com aptidão comercial. Porém, o método de propagação clonal requer cerca 1/3 do tempo apenas, permitindo a exploração da heterose de híbridos e a multiplicação de genótipos elite com características de interesse ainda em segregação, que dificilmente seriam agrupadas em uma cultivar propagada sexuadamente (CARVALHO et al., 2011). As plantas clonadas são idênticas à planta-mãe, garantindo a homogeneidade no desenvolvimento, maior produtividade e melhor qualidade do café, além de permitir a seleção de variedades com ciclo de maturação distinto (BRAGANÇA et al., 2001; CARVALHO et al., 2011; COVRE et al., 2013; PARTELLI et al., 2014; RAMALHO et al., 2016).

Após as avaliações e o teste de compatibilidade genética, os clones selecionados são agrupados de acordo com os objetivos da pesquisa para a formação de uma nova variedade clonal, para serem mantidos no Banco Ativo de Germoplasma e, ou, para demais programas de melhoramento. Logo, vários métodos preditivos podem ser utilizados no estudo da divergência genética, entre eles: a análise multivariada, por meio das medidas de dissimilaridade envolvendo a distância euclidiana e a distância generalizada de Mahalanobis

(D2); métodos de agrupamentos envolvendo os métodos hierárquicos, como ligação média entre grupo (UPGMA) e o método de otimização de Tocher; e técnicas de dispersão gráfica envolvendo análise por componentes principais e por variáveis canônicas (CRUZ et al., 2012).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética de uma população formada por 43 genótipos de *C. canephora* através de característica morfológicas das folhas e biométricas das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio está sendo conduzido em uma lavoura composta por 43 genótipos de *C. canephora*, sendo a maioria selecionada por cafeicultores da região, ou seja, são inéditos em pesquisa científica. O plantio ocorreu em abril de 2014 no município de Nova Venécia, região norte do Estado do Espírito Santo, Brasil, em uma propriedade particular localizada a uma latitude 18°66'23" sul e longitude 40°43'07" oeste, altitude de 50 metros, temperatura média anual é de 23 °C. A região possui clima tropical, caracterizado pelo verão quente e úmido, e inverno seco, classificado como Aw de acordo com Köppen (ALVARES et al., 2013).

Os genótipos estão dispostos em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições, sendo os tratamentos constituídos pelos diferentes genótipos, e cada unidade experimental contém sete plantas. O plantio foi realizado no espaçamento de 3 metros entre linhas e 1 metro entre plantas, o que equivale a 3333 plantas por hectare. Dos 43 genótipos implantados 42 são propagados por estaquia e um por semente, as quais são conduzidas com quatro hastes por planta e toda área experimental possui irrigação por sistema de gotejamento.

Para determinação da área foliar coletou-se folhas do terceiro e/ou quarto par recém-desenvolvidas, de ramos plagiotrópicos situados no terço médio das plantas, num total de 20 folhas por genótipo. As folhas foram acondicionadas em sacos devidamente identificados e encaminhadas ao laboratório. Em seguida, realizou-se a mensuração com auxílio de régua graduada, aferindo o comprimento da nervura central e a máxima largura do limbo foliar (PARTELLI et al., 2006). Posteriormente, foi feita a determinação da área foliar real (AF) por meio do medidor de área foliar Modelo LI-3100, Li-cor, Lincoln, NE, USA. Essas avaliações foram realizadas em duas épocas distintas, sendo a “época 1” em outubro de 2016 e “época 2” em fevereiro de 2017.

As análises biométricas dos 43 genótipos contaram com aferição da altura das plantas (medido da base até o ápice da copa em cm); diâmetro da copa (medido de uma

extremidade a outra da copa em cm); comprimento de ramo plagiotrópico produtivo (medido da inserção no ramo ortotrópico ao ápice em cm); comprimento de ramo ortotrópico (medido a partir da inserção do ramo plagiotrópico avaliado até o ápice em cm); contagem do número de entrenós por ramo plagiotrópico (contagem manual); e comprimento médio de entrenós (estimado através da divisão do comprimento de ramo plagiotrópico pelo número de nós em cm). As mensurações foram feitas com auxílio de uma fita métrica acoplada a uma régua de madeira. Na escolha do ramo plagiotrópico a ser avaliado optou-se por ramos em fase de produção situado no terço inferior do ramo ortotrópico.

No total foram estimadas 14 características, sendo estas: comprimento de ramo plagiotrópico (CRP), número de nós em ramos plagiotrópico (NNP), distância entre nós de ramos plagiotrópico (DEP), comprimento de ramo ortotrópico (CRO), número de nós em ramos ortotrópico (NNO), distância entre nós de ramos ortotrópico (DEO), altura de planta (Alt), diâmetro de copa (Diam), comprimento de folha tempo 1 (CFT1), largura de folha tempo 1 (LFT1), área foliar tempo 1 (AFRT1), comprimento de folha tempo 2 (CFT2), largura de folha tempo 2 (LFT2), área foliar tempo 2 (AFRT2).

Inicialmente foi avaliado o grau de multicolinearidade da matriz de correlação das médias $X'X$ (MONTGOMERY e PECK, 1981), para detectar as variáveis que contribuíram para o surgimento da multicolinearidade, efetuou-se a análise dos autovalores e autovetores. Valores de $NC < 100$ são classificados com multicolinearidade fraca; $100 < NC < 1.000$ a multicolinearidade é de moderada a forte, e, quando $NC > 1.000$, multicolinearidade severa (TEIXEIRA et al., 2012). Logo, visto que o valor de NC estava acima do aceitável, optou-se pela retirada de algumas variáveis por meio de componentes principais, eliminando o componente de maior peso do alto vetor de menor vetor. Ao atingir o valor de NC abaixo de 100, prosseguiu com as demais análises.

Realizou-se análise multivariada (MANOVA) a partir dos componentes de variância, onde foram estimados para cada característica os seguintes parâmetros: coeficiente de variação ambiental (CV_e); coeficiente de variação genético (CV_g); índice de variação (IV), que corresponde a razão entre CV_g e CV_e , e a herdabilidade (h^2). Como medida de dissimilaridade adotou a matriz de distância generalizada de Mahalanobis (D^2) e o agrupamento dos genótipos foi realizado pelo método otimização de Tocher e pelo método hierárquico Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA).

Posteriormente, todas as 14 variáveis foram submetidas à análise de correlação de Pearson. Ainda foi feita análise por componentes principais em gráfico de dispersão do tipo

Biplot. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa R (R Core Team, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de multicolinearidade mostrou que o valor de NC estava acima do aceitável, logo foi necessário realizar a retirada de variáveis. Primeiramente eliminou-se o comprimento de ramos plagiotrópicos resultando em NC de 1405, em seguida retirou a área foliar do T1 baixando para 841,67, com a retirada de distância entre nós de ramo ortotrópico o NC ficou em 445 e com a saída da área foliar do tempo 2 NC foi de 71, atingindo um valor aceitável. Posteriormente, avançou com análise de variância e métodos de agrupamento com as 10 variáveis restantes.

Por meio da análise de variância constatou-se diferença entre os genótipos estudados para todas as características avaliadas ao nível de 1% de significância (Tabela 1), evidenciando a existência de variabilidade genética entre a população quanto às características avaliadas. Estes resultados mostram-se promissores, pois se caracteriza como uma condição básica para a obtenção de ganhos com a seleção (RODRIGUES et al., 2012; CARIAS et al., 2016).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para características biométricas e foliares de 43 genótipos de *C. canephora* e respectivos parâmetros genéticos e ambientais.

Variáveis	QM		Média	CV _e	CV _g	IV	h ₂
	Genótipo	Resíduo					
NNP	11,55**	2,94	15,45	11,09	7,75	0,69	74,54
DEP	0,90**	0,086	3,80	7,74	9,71	1,25	90,41
CRO	250,67**	44,45	71,63	9,31	8,18	0,87	82,22
NNO	29,95**	3,84	19,85	9,87	10,50	1,06	87,16
Alt	534,41**	90,52	149,72	6,35	5,74	0,90	83,06
Diam	1438,53**	258,98	162,14	9,92	8,65	0,87	82,09
CFT1	28,08**	0,74	13,39	6,43	10,07	1,56	97,35
LFT1	6,50**	0,18	5,32	8,16	12,18	1,49	97,06
CFT2	23,68**	1,17	14,55	7,44	8,41	1,29	95,03
LFT2	9,30**	0,31	6,25	8,99	12,37	1,37	96,59

** Significativo a 1% pelo teste F; CV_e: Coeficiente de variação ambiental; CV_g: Coeficiente de variação genético; IV: Índice de variação (CV_g/CV_e); h²: Herdabilidade; NNP: número de nós em ramos plagiotrópico; DEP: distância entre nós plagiotrópico; CRO: comprimento de ramo ortotrópico; NNO: número de nós em ramos ortotrópico; Alt: altura de planta; Diam: diâmetro de copa, CFT1: comprimento de folha tempo 1, LFT1: largura de folha tempo 1; CFT2: comprimento de folha tempo 2, LFT2: largura de folha tempo 2.

Dentre os parâmetros genético estimados, o coeficiente de variação ambiental (CV_e) e coeficiente de variação genético (CV_g) apresentaram valores na magnitude de 6,43 a 11,09% e 7,75 a 12,37%, respectivamente. Pimentel Gomes (1985) os classificam como baixos e médios, pois se considera baixo quando $<10\%$; médio, entre 10 e 20%; alto, entre 20 e 30%; e muito alto, quando superior a 30%. A partir das estimativas do coeficiente de variação residual (CV_e), pode-se inferir que os valores apresentados indicam alta acurácia e precisão experimental para as características em estudo. A presença de variabilidade genética é confirmada e quantificada através do coeficiente de variação genético, que expressa a intensidade da variação genética em relação à média do caráter (RESENDE, 1991). Os coeficientes de variação genético acima de 7% são considerados altos por Sebbenn et al. (1998). Assim, apenas altura de planta apresenta CV_g baixo, com valor de 5,74%, os demais estão de acordo com a classificação proposta e devem ser considerados como critério para seleção de genótipos superiores.

O índice de variação que é dado pela relação de CV_g e CV_e , variou de 0,69 a 1,56. A razão entre o coeficiente de variância genético (CV_g) e o ambiental (CV_e) exibe a parte da variância total que é explicada pelo genótipo (VASCONCELOS et al., 2012). Quando o quociente estimado for maior ou igual a 1, a variação genética disponível é a maior responsável pela variação estimada dos dados experimentais (LEITE et al., 2016). Ferrão et al. (2008) encontraram valores de CV_g/CV_e com magnitudes entre 0,70 e 2 na maioria dos caracteres estudados, e os considerou adequados como indicador da maior importância dos efeitos genéticos sobre o ambiental no melhoramento.

A herdabilidade foi satisfatória para todas as variáveis, tendo como menor valor 74,54% e maior 97,06%. De forma semelhante Dalcomo et al. (2015) obteve herdabilidades na magnitude de 67,12 a 93,21% para maioria das variáveis avaliadas em 22 genótipos de café. A herdabilidade no estudo genético do caráter tem seu papel preditivo, expressando a confiabilidade com que o valor fenotípico representa o valor genético (FERRÃO et al., 2008; SILVA et al., 2015; DALCOMO et al., 2015; CARIAS et al., 2016). Altas estimativas deste parâmetro indicam a possibilidade de selecionar genótipos superiores com maior segurança (OLIVEIRA et al., 2015), isto é reforçado juntamente com altos valores de CV_g e relação CV_g/CV_e (RODRIGUES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015; LEITE et al., 2016). Estes resultados sugerem a predominância dos componentes genéticos em comparação aos ambientais, caracterizando, portanto, condições favoráveis ao melhoramento para as características avaliadas.

O agrupamento pelo método de otimização de Tocher, utilizando como medida de dissimilaridade genética a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), permitiu a formação de seis grupos distintos (Tabela 2). O elevado número de grupos demonstra a ampla variabilidade genética existente entre os genótipos, visto que, o método preconiza minimizar a distância intragrupo e maximizar a distância intergrupos. No grupo I formou-se um grande grupo abrangendo 35 genótipos do total, o grupo II correspondeu a três genótipos (22, 38, 42), o grupo III foi composto por dois genótipos (14, 23), e os demais três grupos contaram com um genótipo cada, sendo 25, 2 e 37, respectivamente.

Tabela 3. Agrupamentos entre 43 genótipos de *Coffea canephora* pelo método de Tocher, considerando dez características biométricas e foliares.

Grupos	Genótipos
I	17 33 13 39 15 32 35 24 5 29 9 40 30 1 12 27 23 20 21 28 34 7 41 36 10 26 18 4 6 3 31 16 11 8 19
II	22 38 42
III	14 43
IV	25
V	2
VI	37

Para a espécie *C. canephora* o método de agrupamento Tocher foi empregado por Fonseca et al. (2006), quando avaliou 32 clones que compõe três variedades clonais; também por Ivoglo et al. (2008) com 21 progênies de meios-irmãos; e por Covre et al. (2016) e Giles et al. (2018) com 34 e 30 genótipos promissores, no qual obtiveram a formação de três, quatro, oito e três grupos, respectivamente.

O agrupamento pelo método Hierárquico UPGMA, utilizando como medida de dissimilaridade genética a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), permitiu a formação do dendrograma que ilustra a distância genética entre os genótipos estudados. Ao se estabelecer o limite máximo de 40% de dissimilaridade entre os genótipos seguindo os princípios de Mojema (1977), observou-se a formação de cinco grupos distintos (Figura 1).

No primeiro e no segundo grupo encontram-se apenas o genótipo 25 e 43, respectivamente. O terceiro grupo corresponde ao maior número de genótipos, 36 do total (83,72%), sendo estes: 31, 11, 14, 4, 10, 34, 18, 26, 3, 6, 16, 1, 2, 28, 12, 20, 29, 5, 40, 9, 7, 36, 27, 21, 41, 30, 35, 24, 32, 15, 13, 17, 33, 8, 19 e 39, o quarto grupo é composto apenas pelo genótipo 37 e o quinto é representado por 4 genótipos, sendo estes o 22, 23, 38 e 42 (Figura 1).

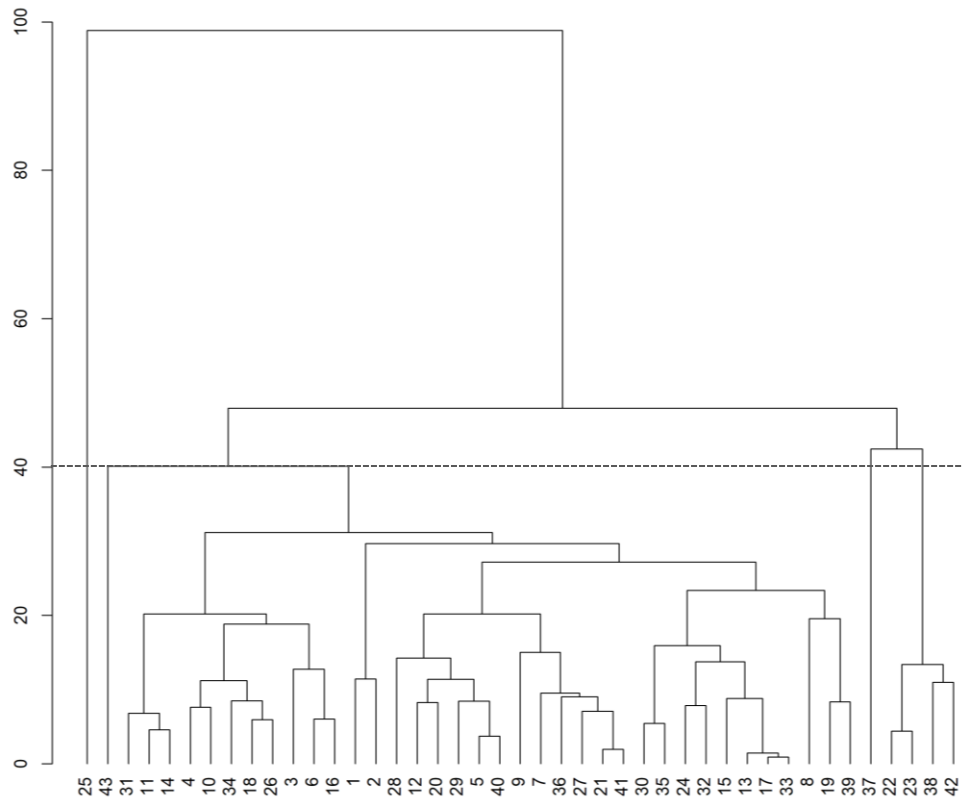


Figura 1. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre 43 genótipos de *Coffea canephora* obtido pelo método de agrupamento UPGMA, considerando dez características biométricas e foliares.

Estudo feito por Ivoglo et al. (2008) verificou a formação de nove grupos quando analisou a dissimilaridade de 21 progênies de meios-irmãos de *C. canephora* pelo método UPGMA com corte realizado a 45%. Guedes et al. (2013) avaliando 12 acessos *C. arabica* L. var. Maragogipe Hoert. ex Frohner obteve a formação de 7 grupos com corte feito a 15%. Trabalhos de Covre et al. (2016) e Giles et al. (2018) verificaram a formação de sete e três grupos em uma população de 34 e 30 genótipos de café conilon, respectivamente. Dalcomo et al. (2015) avaliando 17 características morfoagronômicas de 22 genótipos de café conilon obteve a formação de seis grupos com corte a 45%. Assim como ocorreu neste estudo, todos os trabalhos citados obtiveram grupos compostos por progênies/acessos/genótipos isolados, evidenciando a dissimilaridade destes em comparação aos demais.

Quando se compara os grupos formados pelo método de otimização de Tocher e hierárquico de UPGMA, nota-se bastante similaridade em suas composições, com apenas algumas particularidades. Semelhanças entre os métodos também foram relatados por Ivoglo et al. (2008), Guedes et al. (2013), Covre et al. (2016) e Giles et al. (2018). Para melhor compreensão e discussão das principais características que diferiram para formação dos

grupos pelo método UPGMA, optou por confeccionar os valores médios de cada variável de acordo com os agrupamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Médias das características biométricas e foliares por grupo formado pelo método UPGMA.

Grupos	NNP	DEP	CRO	NNO	Alt	Diam	CFT1	LFT1	CFT2	LFT2
	n°	cm		n°				cm		
I	12,00	4,04	68,33	20,67	147,83	158,33	17,41	6,69	14,83	5,89
II	18,33	3,50	69,33	15,83	158,00	183,33	15,09	5,77	15,27	6,18
III	15,35	3,81	71,21	19,43	149,81	163,06	13,25	5,33	14,67	6,41
IV	17,33	4,95	94,17	19,33	174,00	179,33	14,73	4,92	14,75	5,59
V	16,04	3,43	71,25	24,58	141,33	145,33	12,98	4,93	13,17	5,13

NNP: número de nós em ramos plagiotrópico; DEP: distância entre nós plagiotrópico; CRO: comprimento de ramo ortotrópico; NNO: número de nós em ramos ortotrópico; Alt: altura de planta; Diam: diâmetro de copa, CFT1: comprimento de folha tempo 1, LFT1: largura de folha tempo 1; CFT2: comprimento de folha tempo 2, LFT2: largura de folha tempo 2.

O genótipo 25 que se isolou no grupo I apresentou o menor valor de número de nós em ramos plagiotrópicos, menor comprimento de ramos ortotrópico e maior largura de folha no T1. Propriedades contidas nas plantas que compõe este grupo devem ser analisadas com maior atenção, uma vez que cafeeiros produtivos normalmente tendem a apresentar menor distância entre nós e maior número de nós (TOMAZ et al., 2005), ao contrário do que foi averiguado para estes genótipos. Maior largura de folha em um ambiente favorável pode favorecer os processos fotossintéticos em função de maior área para interceptação de energia luminosa (BRINATE et al., 2015a,b; KHAN et al., 2016).

O genótipo 43 que compõe o grupo II apresentou o maior número de nós em ramos plagiotrópicos, maior diâmetro de copa e comprimento de folhas nos dois tempos avaliado. Estas características são de grande interesse em uma planta de cafeeiro, e podem estar correlacionadas a propriedades produtivas e devem ser consideradas em processos de seleção. Uma vez que, a obtenção de melhorias em produtividade ainda é um dos principais focos do melhoramento dos cafeeiros, aliada a outras características agrônômicas (CARVALHO et al., 2010, 2016).

O terceiro grupo formado com maior número de genótipos apresentou em média valores intermediários aos demais para maioria das características avaliadas, apenas largura de folha no T2 se destaca com a maior média. O grupo IV composto pelo genótipo 37 se destacou com maior distância entre nós de ramo plagiotrópico, maior comprimento de ramos ortotrópico e maior altura de planta. Tais características do genótipo 37 normalmente não são interessantes em uma planta para cultivo comercial e podem caracterizar uma planta menos produtiva e de difícil manejo.

O quinto grupo composto pelos genótipos 22, 23, 38 e 42 se diferenciou dos demais em função do maior número de nós em ramos ortotrópicos, menor distância entre nós de ramos plagiotrópicos, menor altura de planta, menor diâmetro de copa, menor comprimento e largura de folhas no T1 e T2. Esses genótipos possuem características importantes, pois atualmente os melhoristas preconizam a obtenção de cafeeiros com menor porte. Maior número de nós em ramos ortotrópicos esta vinculado a maior emissão de ramos produtivos (TOMAZ et al., 2005; DUBBERSTEIN et al., 2017) e menor distância entrenós pode conferir maior numero de nós, que se consagra como uma característica marcante em plantas com maior potencial produtivo (FREITAS et al., 2007).

A análise de correlação com todas as variáveis resultou num total de 91 correlações, sendo que 42 foram significativas, com valores desde bem fracos a muito fortes, positivos e negativos (Figura 2).

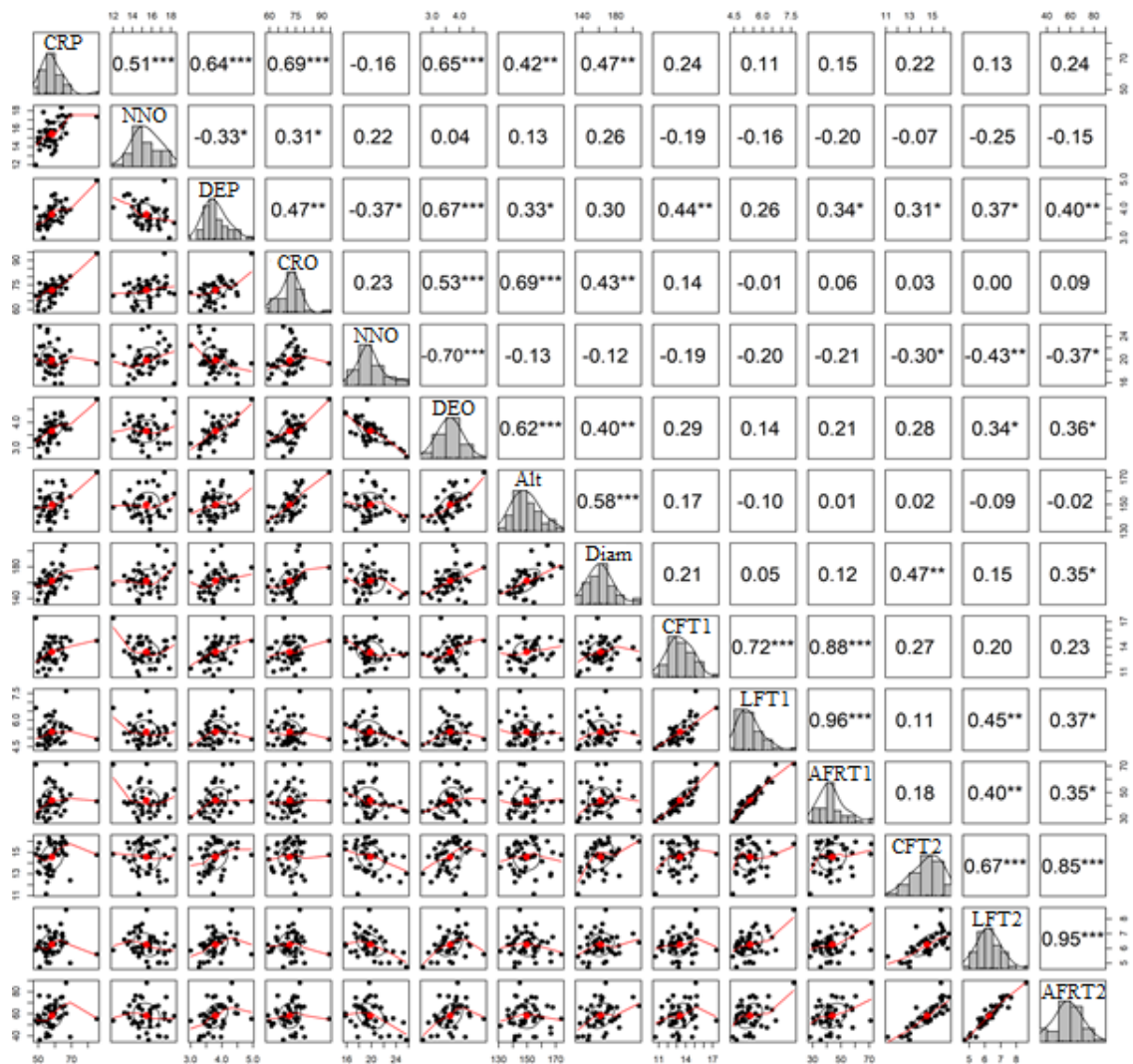


Figura 2: Correlação entre características biométricas e morfológicas de folhas (CRP: comprimento de ramo plagiotrópico; NNP: número de nós em ramos plagiotrópico; DEP:

distância entre nós plagiométrico; CRO: comprimento de ramo ortométrico; NNO: número de nós em ramos ortométrico; DEO: distância entre nós ortométrico; Alt: altura de planta; Diam: diâmetro de copa, CFT1: comprimento de folha tempo 1, LFT1: largura de folha tempo 1; AFRT1: área foliar tempo 1; CFT2: comprimento de folha tempo 2, LFT2: largura de folha tempo 2; AFRT2: área foliar tempo 2) de 43 genótipos de *C. canephora*. (*, ** e *** correspondem a significância de $p < .05$, $p < .01$ e $p < .001$, respectivamente).

Segundo Devore (2006) os valores de 0,00 a 0,19 apresentam correlação bem fraca; de 0,20 a 0,39 correlação fraca; 0,40 a 0,69 correlação moderada; 0,70 a 0,89 correlação forte; 0,90 a 1,00 correlação muito forte. Nogueira et al. (2012), relata que três aspectos devem ser considerados na interpretação de correlações: a magnitude, a direção e a significância. Estimativa de coeficiente de correlação positiva indica a tendência de uma variável aumentar quando a outra também aumenta, e correlações negativas indicam tendência de uma variável aumentar enquanto a outra diminui.

O comprimento do ramo plagiométrico apresentou correlação positiva moderada com número de nós em ramos plagiométrico, distância entre nós de ramo plagiométrico, comprimento de ramo ortométrico, diâmetro de copa e altura de planta. Teixeira et al. (2012) obteve alta correlação entre comprimento de ramo plagiométrico e número de nós e altura de planta e, também verificou que o comprimento de ramo plagiométrico tem efeito direto expressivo sobre a produção. Estudo de Carvalho et al. (2010), também evidenciaram correlação moderada entre comprimento e número de nós em ramos plagiométricos, e valor alto entre comprimento de ramo plagiométrico e altura de planta. Assim como Freitas et al. (2007) verificou que a característica comprimento de ramo plagiométrico é indicativo de diâmetro da copa e Teixeira et al. (2013) constataram correlação de 0,70 entre número de nós e comprimento de ramo plagiométrico.

Número de nós em ramos plagiométricos apresentou correlação fraca negativa com distância entre nós de ramos plagiométricos e positiva com comprimento de ramo ortométrico. Este comportamento é interessante, pois mostra que maior distância entre nós diminui o número de nós presente nos ramos e menor número de nós é indicativo de menor produção de frutos (TOMAZ et al., 2005; FREITAS et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2012).

Distância entre nós de ramo plagiométrico se correlacionou de forma positiva, porém fraca, com altura de planta, área foliar T1, comprimento de folha T2, largura de folha T2 e negativa com número de nós de ramo ortométrico. Correlações moderadas são vista com comprimento de ramo ortométrico, distância de nós de ramo ortométrico, comprimento de folha T1, área foliar T2. Segundo Rocha et al. (2013) a correlação positiva entre altura e

distância entre rosetas no ramo plagiotrópico indica a possibilidade de selecionar plantas de menor porte e de menor distância entre rosetas.

O comprimento de ramos ortotrópico evidenciou correlações moderadas com distância entre nós de ramo ortotrópico, altura de planta e diâmetro de copa. Esses resultados demonstram a importância dessas características para a arquitetura da planta, logo maior tamanho de ramo ortotrópico pode significar plantas de maior porte. Contudo, nem sempre é interessante obter tal comportamento, pois o porte baixo das plantas é uma característica desejável e controlada no processo de seleção por facilitar os tratamentos culturais e a colheita manual ou mecanizada (CARVALHO et al., 2013). Em sistemas adensados há preferência por variedades de porte baixo devido à maior produtividade por área cultivada (FREITAS et al., 2007). Entretanto, pode haver correlações positivas entre altura de plantas e a produtividade (CARVALHO et al., 2010; VALADARES et al., 2016), fato comprovado por Teixeira et al. (2012) e Bitika e Sakiyama (2017) que obtiveram correlação de 0,73 e 0,42, respectivamente.

Número de nós em ramo ortotrópico mostrou correlação forte com distância entre nós de ramo ortotrópico e correlações fracas e negativas com comprimento de folha, largura de folha e área foliar no T2. Teixeira et al. (2013) verificou correlações de 0,29 e 0,32 para número de nós comparados com comprimento e largura de folha, respectivamente. Distância entre nós de ramo ortotrópico apresentou correlação moderada e positiva com altura de planta e diâmetro de copa, correlação fraca e negativa com largura de folha e área foliar no T2. De acordo com Paulo et al. (2005) a altura da planta é determinada principalmente pelo alongamento do entrenó.

A correlação entre altura de planta e diâmetro de copa se mostrou positiva moderada no valor de 0,58. Resultado distinto foi obtido por Freitas et al. (2007), onde a correlação entre a altura de plantas e o diâmetro de copa revelou-se estatisticamente significativa porém negativa (-0,8102), já Teixeira et al. (2013) e Bitika e Sakiyama (2017) diagnosticaram correlações positivas de 0,65 e 0,87, respectivamente, entre altura de planta e diâmetro de copa.

Correlações moderadas e fracas ocorreram entre diâmetro de copa e comprimento de folha no T1 e T2, respectivamente. Teixeira et al. (2013) obtiveram valor de correlação de 0,46 entre diâmetro de copa e comprimento de folha. Além disso, o comprimento de folha T1 se correlacionou forte com largura de folha e área foliar do T1. A Largura de folha T1 tem correlação muito forte com área foliar T1. Comprimento de folha T2 apresenta correlação moderada e forte com largura e área foliar T2. Largura de folha e área foliar no tempo 2 possuem correlação muito forte (0,95).

Valores de correlação forte e muito forte entre comprimento e largura de folha com área foliar de ambas as avaliações mostram o quanto essas variáveis são dependentes. Resultados similares foram averiguados por Teixeira et al. (2012) e (2013) que encontraram valores de 0,88 entre comprimento e largura do 4º par de folha para 269 acessos de café arábica. A área da superfície foliar de uma planta de café é indicativa do rendimento potencial da cultura, pois maior área foliar implica em maior superfície de interceptação de luz, o que poderá resultar em taxas fotossintéticas mais elevadas e melhor conversão de carboidratos em grãos de café (VALADARES et al., 2016, WALIA e KUMAR, 2016). Logo, nos processos de seleção pode considerar a escolha de materiais com folhas maiores.

Análise por componentes principais mostrou que os dois primeiros componentes PC1 e PC2 explicaram 56,77% da variação total (Figura 3). Cruz et al. (2011) relatam que o ideal é que os dois primeiros componentes principais concentrem a maior quantidade de variância dos dados para que haja divergência entre grupos de genótipos.

No gráfico Biplot, as variáveis são representadas por vetores e os genótipos por números. Quanto maior o vetor, maior a influência da variável no agrupamento, e quanto menor o ângulo entre os vetores, maior a correlação entre as variáveis. Com base na projeção dos genótipos no plano cartesiano definido pelos dois componentes principais, nota-se que alguns se concentram próximo ao zero sendo considerada uma distribuição normal, mas muitos se dispersam, indicando considerável divergência quanto às características avaliadas.

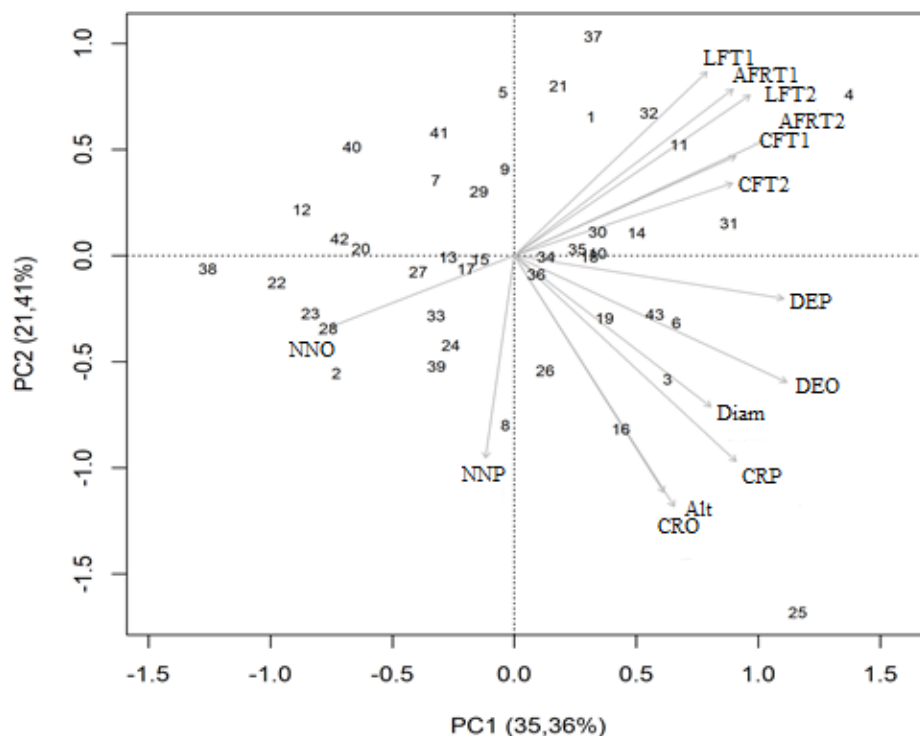


Figura 3: Análise por componentes principais para 14 variáveis biométricas e foliares de 43 genótipos de *Coffea canephora*. (CRP: comprimento de ramo plagiotrópico; NNP: número de nós em ramos plagiotrópico; DEP: distância entre nós plagiotrópico; CRO: comprimento de ramo ortotrópico; NNO: número de nós em ramos ortotrópico; DEO: distância entre nós ortotrópico; Alt: altura de planta; Diam: diâmetro de copa, CFT1: comprimento de folha tempo 1, LFT1: largura de folha tempo 1; AFRT1: área foliar tempo 1; CFT2: comprimento de folha tempo 2, LFT2: largura de folha tempo 2; AFRT2: área foliar tempo 2).

Observando o PC1, os genótipos 25 e 37 apresentaram maiores distâncias. Tal comportamento ocorre certamente, pois o genótipo 25 detém a maior distância entre nós de ramos plagiotrópicos, maior comprimento de ramo ortotrópico (94,16 cm) e maior altura de planta (174 cm), pela sua posição e distância dos demais este pode ser considerado um outlier. O genótipo 37 se distingue por apresentar menor número de nós em ramos plagiotrópico. Ambos formaram grupos isolados no dendrograma, logo essas características são muito peculiares em comparação aos demais genótipos.

No PC2 verifica-se maior distância entre os genótipos 4 e 38. As características que mais diferenciam o genótipo 38 é a presença de maior número de nós em ramos ortotrópicos e os menores valores de largura de folhas, já o genótipo quatro se destaca com suas folhas compridas e largas, sendo detentor da maior largura de folhas em comparação aos demais.

Para as características foliares há grandes cargas fatoriais positivas no componente 1 e 2, onde todas estão concentradas, confirmando o alto grau de correlação entre as mesmas. Altura de planta, diâmetro de copa, comprimento de ramo ortotrópico e plagiotrópico, distância entre nós de ramos ortotrópico e plagiotrópico também tem grandes cargas fatoriais positivas no PC1 e negativas no PC2, logo todas essas características estão relacionadas e contribuem para o porte e estrutura da planta. Já número de nós em ambos os ramos se mantem isoladas e têm grandes cargas fatoriais negativas no PC 1 e 2. Nota-se que o comprimento de ramo ortotrópico e altura de planta se sobrepõem, bem como, o comprimento de ramo plagiotrópico se encontram muito próximo de diâmetro de copa, reforçando a ideia de que estas variáveis se correlacionam positivamente.

É importante esclarecer que a distribuição dos genótipos está relacionada com a posição e direção dos vetores que mais influencia e os diferencia dos demais. Exemplificando, o genótipo quatro apresentou maior área foliar e esta exatamente posicionada acima desta característica. O mesmo acontece com genótipo 25 que detém maior altura de planta e se encontra posicionado abaixo desta característica. Demais genótipos que se encontram posicionados próximos à determinada variável, apresentam em sua estrutura características similares. Estas análises permitem uma melhor confirmação das correlações existentes entre

as variáveis e a distribuição dos genótipos evidencia as características que trazem em sua constituição, logo, auxiliam no processo de seleção a escolha de plantas com características desejáveis.

CONCLUSÕES

As estimativas dos parâmetros genéticos revelaram a existência de variabilidade genética e potencial seletivo entre os genótipos de café conilon.

Os métodos de otimização de Tocher e hierárquico UPGMA apresentaram consistência no agrupamento dos genótipos, ordenando-os em seis e cinco grupos dissimilares, respectivamente, sendo que o genótipo 25 e 37 se destacam com a maior dissimilaridade, constituindo grupos isolados em ambos os métodos;

A análise de correlação e componentes principais evidenciou as características com maior grau de correlação, auxiliando na escolha de materiais mais promissores.

REFERÊNCIAS

- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- ASSIS, G.A.; GUIMARÃES, R.J.; SCALCO, M.S.; COLOMBO, A.; MORAIS, A.R.; CARVALHO, J.P.S. Correlação entre crescimento e produtividade do cafeeiro em função do regime hídrico e densidade de plantio. *Bioscience Journal*, v. 30, n. 3, p. 666-676, 2014.
- BRAGANÇA, S.M.; CARVALHO, C.H.S.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G. Variedades clonais de café Conilon lançadas para o estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2001000500006>.
- BRINATE, S.V.B.; MARTINS, L.D.; RODRIGUES, W.N.; COLODETTI, T.V.; AMARAL, J.F.T.; TOMAZ, M.A. Accuracy of linear methods to estimate the leaf area of genotypes of conilon coffee. *African Journal of Agricultural Research*. v. 10, n. 30, p. 2955-2960, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2014.9336> a.
- BRINATE, S.V.B.; RODRIGUES, W.N.; MARTINS, L.D.; COLODETTI, T.V.; TOMAZ, M.A.; AMARAL, J.F.T. Applicability of the Method of Linear Dimensions to Estimate Leaf Area in Improved Genotypes of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *American Journal of Plant Sciences*, v. 6, p. 651-658, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.65070> b.
- CABRAL, P.D.S.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; FREITAS, I.L.J.; RIBEIRO, R.M.; SILVA, T.R.C.; Relação causa e efeito de caracteres quantitativos sobre a capacidade de expansão do grão em milho-pipoca. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 1, p. 108-117, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160013>.

- CARIAS, C.M.O.M.; GRAVINA, G.A.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.F.; VIVAS, M.; VIANA, A.P. Predição de ganhos genéticos via modelos mistos em progênies de café conilon. *Coffee Science*, v. 11, n. 1, p. 39-45, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v11i1.961>.
- CARVALHO, A.M.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, G.R.; BOTELHO, C.E.; GONÇALVES, F.M.A.; FERREIRA, A.D. Correlação entre crescimento e produtividade de cultivares de café em diferentes regiões de Minas Gerais, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, n. 3, p. 269-275, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010000300006>.
- CARVALHO, A.M.D.; MENDES, A.N.G.; REZENDE, F.V.; BOTELHO, C.E.; CARVALHO, G.R.; FERREIRA, A.D. Seleção de progênies de cafeeiros do grupo Catuaí. *Coffee Science*, v. 11, n. 2, p. 244-254, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v11i2.1081>.
- CARVALHO, C.H.S.; REZENDE, J.C.; ALMEIDA, G.R.R.; TEIXEIRA, J.B.; PADILHA, L. Características agrônômicas e morfológicas de cafeeiro 'Catuaí Vermelho' propagado por embriogênese somática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, n. 4, p. 378-383, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000400006>.
- CARVALHO, G.R.; BOTELHO, C.E.; REZENDE, J.C.; FERREIRA, A.D.; CUNHA, R.L.; PEDRO, F.C. Comportamento de progênies F4 de cafeeiros arábica, antes e após a poda tipo esqueletamento. *Coffee Science*, v. 8, n. 1, p. 33-42, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v8i1.323>.
- CILAS, C.; MONTAGNON, C.; BAR-HEN, A. Yield stability in clones of *Coffea canephora* in the short and medium term: longitudinal data analyses and measures of stability over time. *Tree Genetics & Genomes*. v. 7, n. 2, 421-429, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0344-4>.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de café, v. 5– Safra 2018, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-66, 2018.
- CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia*, v. 20, n. 1, p. 787-804, 1961. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051961000100034>.
- COVRE, A.M.; CANAL, L.; PARTELLI, F.L.; ALEXANDRE, R.S.; FERREIRA, A.; VIEIRA, H.D. Development of clonal seedlings of promising Conilon coffee (*Coffea canephora*) genotypes. *Australian Journal of Crop Science*, v. 10, n. 3, p.385-392, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.03.p7235>.
- COVRE, A.M.; PARTELLI, F.L.; MAURI, A.L.; DIAS, M.A. Crescimento e desenvolvimento inicial de genótipos de café Conilon. *Revista Agro@mbiente On-line*, v. 7, n. 2, p. 193-202, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v7i2.944>.
- CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. Minas Gerais: Suprema Gráfica Editora; 2011. 620 p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 4. ed. Viçosa, MG: UFV, 2012. 668 p.
- DALCOMO, J.M.; VIEIRA, H.D.; FERREIRA, A.; LIMA, W.L.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G.; PARTELLI, F.L. Evaluation of genetic divergence among clones of conilon coffee after scheduled cycle pruning. *Genetics and Molecular*

- Research, v. 14, n. 4, p. 15417-15426, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.November.30.19>.
- DEVORE, J.L. Probabilidade e estatística: para engenharia e ciências. São Paulo, SP: Thomson Pioneira, 2006. 706 p.
- DUBBERSTEIN, D.; PARTELLI, F.L.; DIAS, J.R.M.; ESPINDULA, M.C. Influência da adubação no crescimento vegetativo de cafeeiros na Amazônia sul ocidental. *Coffee Science*, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v12i2.1228>.
- FASCELLA, G.; DARWICH, S.; ROUPHAEL, Y. Validation of a leaf area prediction model proposed for rose. *Chilean Journal of Agricultural Research*, v. 73, n. 1, p.73-76, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392013000100011>.
- FAVARIN, J.L.; NETO, D.D.; GARCÍA Y GARCÍA, A.; VILLA NOVA, N.A.; FAVARIN, M.G.G.V. Equações para a estimativa do índice de área foliar do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 6, p. 769-773, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2002000600005>.
- FERRÃO, R.G.; CRUZ, C.D.; FERREIRA, A.; CECON, P.R.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.F.; CARNEIRO, P.C.S.; SILVA, M.F. Parâmetros genéticos em café Conilon. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-69, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000100009>.
- FONSECA, A.F.A.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D.; SAKAIYAMA, N.S.; FERRÃO, M.Q.G.; FERRÃO, R.G.; BRAGANÇA, S.M. Divergência genética em café conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 4, p. 599-605, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000400008>.
- FREITAS, Z.M.T.S.; OLIVEIRA, F.J.; CARVALHO, S.P.; SANTOS, V.F.; SANTOS, J.P.O. Avaliação de caracteres quantitativos relacionados com o crescimento vegetativo entre cultivares de café arábica de porte baixo. *Bragantia*, v. 66, n. 2, p. 267-275, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052007000200010>.
- GICHIMU, B.M.; OMONDI, C.O. Early performance of five newly developed lines of *Arabica Coffee* under varying environment and spacing in Kenya. *Agriculture and Biology Journal of North America*, v. 1, n. 1, p. 32-39, 2010. DOI: <http://hdl.handle.net/123456789/108>.
- GILES, J.A.D.; PARTELLI, F.L.; FERREIRA, A.; RODRIGUES, J.P.; OLIOSI, G.; LIMA, F.H. Genetic diversity of promising conilon coffee clones based on morpho-agronomic variables. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 2, p. 2437-2446, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170523>.
- GUEDES, J.M.; VILELA, D.J.M.; REZENDE, J.C.; SILVA, F.L.; BOTELHO, C.E.; CARVALHO, S.P. Divergência genética entre cafeeiros do germoplasma Maragogipe. *Bragantia*, v. 72, n. 2, p. 127-132, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052013000200003>.
- IVOGLO, M.G.; FAZUOLI, L.C.; OLIVEIRA, A.C.B.; GALLO, P.B.; MISTRO, J.C.; SILVAROLLA, M.B.; TOMA-BRAGHINI, M. Divergência genética entre progênies de café robusta. *Bragantia*, v. 67, n. 4, p. 823-831, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000400003>.

- KHAN, F.; BANDAY, F.; NARAYAN, S.; KHAN, F.; BHAT, S. Use of Models as Non-destructive Method for Leaf Area Estimation in Horticultural Crops. *IRAInternational Journal of Applied Sciences*, v. 4, n. 1, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.21013/jas.v4.n1.p19>.
- LEITE, W.S.; PAVAN, B.E.; MATOS FILHO, C.H.A.; ALCANTARA NETO, F.; OLIVEIRA, C.B.; FEITOSA, F.S. Estimativas de parâmetros genéticos, correlações e índices de seleção para seis caracteres agrônômicos em linhagens F8 de soja. *Comunicata Scientiae*, v. 7, n. 3, p. 302-310, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.14295/CS.v7i3.1176>.
- LIMA, A.E.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, G.R.; BOTELHO, C.E.; CASTRO, E.M.; CARDOSO, D.A. Desempenho agrônômico de populações de cafeeiros do grupo 'Bourbon'. *Coffee Science*, v. 11, n. 1, p. 22 - 32, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v11i1.957>
- MOJENA, R. Hierárquical grouping method and stopping rules: an evaluation. *Computer Journal*, v. 20, p. 359-363, 1977.
- MONTGOMERY, D.C.; PECK, E.A. Introduction to linear regression analysis. New York: John Wiley, 1981. 504p.
- MORAES, M.S.; TEIXEIRA, A.L.; RAMALHO, A.R.; ESPÍNDULA, M.C.; FERRÃO, M.A.G.; ROCHA, R.B. Characterization of gametophytic selfincompatibility of superior clones of *Coffea canephora*. *Genetics and Molecular Research*, v. 17, n. 1, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039876>.
- NOGUEIRA, A.P.O.; SEDIYAMA, T.; SOUSA, L.B.; HAMAWAKI, O.T.; CRUZ, C.D.; PEREIRA, D.G.; MATSUO, E. Análise de trilha e correlações entre caracteres em soja cultivada em duas épocas de semeadura. *Biosciense Journal*, v. 28, n. 6, p. 877-888, 2012.
- OLIVEIRA, N.S.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; SILVA, D.O.; PASTORIZA, R.J.G.; MELO, R.A.; SILVA, J.W.; MENEZES, D. Seleção e parâmetros genéticos de progênies de coentro tolerantes ao calor. *Horticultura Brasileira*, v. 33, n. 3 p. 319-323, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000300007>.
- PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; DETMANN, E.; CAMPOSTRINI, E. Estimativa da área foliar do cafeeiro conilon a partir do comprimento da folha. *Ceres*, v. 53, n. 306, p. 204-210, 2006.
- PAULO, E.M.; FURLANI JUNIOR, E.; FAZUOLI, L.C. Comportamento de cultivares de cafeeiro em diferentes densidades de plantio. *Bragantia*, v. 64, n. 3, p. 397-409, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052005000300009>.
- PEDRO, F.C.; GUIMARÃES, R.J.; CARVALHO, G.R.; BOTELHO, C.E.; REZENDE, J.C.; CARVALHO, A.M. Comportamento agrônômico de progênies F4 de cafeeiros oriundos do cruzamento entre os cultivares Mundo Novo e Catuaí. *Revista Ceres*, v. 58, n. 3, p. 315-322, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2011000300011>.
- PEREIRA, A.A.; MORAIS, A.R.; SCALCO, M.S.; FERNANDES, T.J. Modelagem do diâmetro de copa do cafeeiro podado cultivado em diferentes densidades e regimes hídricos. *Coffee Science*, v. 11, n. 4, p. 495-501, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v11i4.1145>.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de Estatística Experimental. São Paulo: Nobel, 1985. 467 p.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RAMALHO, A.R.; ROCHA, R.B.; SOUZA, F.F.; VENEZIANO, W.; TEIXEIRA, A.L. Progresso genético da produtividade de café beneficiado com a seleção de clones de cafeeiro

- 'Conilon'. Revista Ciência Agronômica, v. 47, n. 3, p. 516-523, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160062>.
- RESENDE, M.D.V. Correções nas expressões do progresso genético com seleção em função da amostragem finita dentro de famílias de populações e implicações no melhoramento florestal. Boletim Pesquisa Florestal, Colombo, n. 22/23, p. 61-77, 1991.
- ROCHA, R.B.; VIEIRA, D.S.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L. Caracterização e uso da variabilidade genética de banco ativo de germoplasma de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Coffee Science, v. 8, n. 4, p. 478-485, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v8i4.504>.
- RODRIGUES, W.N.; V COLODETTI, T.V.; BRINATE, SVB.; MARTINS, L.D.; TOMAZ, M.A. Genetic Variability for Sprout Growth among Genotypes of *Coffea canephora* Led by Bending of Orthotropic Stems. Genetics and Molecular Research. v. 16. n. 4, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039813>.
- SCHMILDT, E.R.; AMARAL, J.A.T.; SCHMILDT, O.; SANTOS, J.S. Análise comparativa de equações para estimativa da área foliar em cafeeiros. Coffee Science, v. 9, n. 2, p. 155-167, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v9i2.573>.
- SEBBENN, A.M.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; KAGEYAMA, P.Y.; MACHADO, J.A.R. Parâmetros genéticos na conservação da cabreúva – *Myroxylon peruiferum* L.F. Allemão. Scientia Forestalis, v. 53, p. 31-38, 1998.
- SILVA, F.L.; BAFFA, D.C.F.; REZENDE, J.C.; OLIVEIRA, A.C.B.; PEREIRA, A.A.; CRUZ, C.D. Variabilidade genética entre genótipos de café robusta no estado de Minas Gerais. Coffee Science, v. 10, n. 1, p. 20-27, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v10i1.720>.
- TEIXEIRA, A.L.; GONÇALVES, F.M.A.; REZENDE, J.C.; CARVALHO, S.P.; PEREIRA, A.A.; MORAES, B.F.X.; TEIXEIRA, L.G.V. Seleção precoce para produção de grãos em café arábica pela avaliação de caracteres morfológicos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 47, n. 8, p. 1110-1117, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000800011>.
- TEIXEIRA, A.L.; GONÇALVES, F.M.A.; REZENDE, J.C.; ROCHA, R.B.; PEREIRA, A.A. Principal component analysis on morphological traits in juvenile stage arabica coffee. Coffee Science, v. 8, n. 2, p. 197-202, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v8i2.411>
- TEIXEIRA, O.R.; PASSOS, F.R.; MENDES, F.Q. Qualidade físico-química e microscópica de 14 marcas comerciais de café torrado e moído. Coffee Science, v. 11, n. 3, p. 395-402, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v11i3.1111>.
- TOMAZ, M.A.; SAKIYAMA, N.S.; MARTINEZ, H.E.P.; CRUZ, C.D.; PEREIRA, A.A.; FREITAS, R.S. Porta-enxertos afetando o desenvolvimento de plantas de *Coffea arabica* L. Ciência Rural, v. 35, n. 3, p. 570-575, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000300012>.
- TRAN, H.T.M.; SLADE LEE, L.; FURTADO, A.; SMYTH, H.; HENRY, R.J. Advances in genomics for the improvement of quality in coffee. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 96, 2016, p. 3300-3312. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7692>.
- TRAN, H.T.M.; VARGAS, C.A.C.; SLADE LEE, L.; FURTADO, A.; SMYTH, H.; HENRY, R.J. Variation in bean morphology and biochemical composition measured in different genetic groups of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) Tree Genetics & Genomes, v. 13, n. 3, 1-14, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1138-8>.

VALADARES, F.V.; SANTOS, R.M.; DUTRA, I.P.; SOUZA NETO, J.D.; MOULIN, M.M. Análise morfoagronômica e molecular das cultivares de café do IFES *campus* de Alegre. Enciclopédia Biosfera, v. 13, n. 23, p. 87-102, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2016_008.

VASCONCELOS, E.S.; REIS, M.S.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D. Estimativas de parâmetros genéticos da qualidade fisiológica de sementes de genótipos de soja produzidas em diferentes regiões de Minas Gerais. Semina: Ciências Agrárias, v. 33, n. 1, p. 65-76, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p65>.

WALIA, W.; KUMAR, R. Development of Nondestructive Leaf Area Estimation Model for Valeriana (*Valeriana Jatamansi Jones*), Communications in Soil Science and Plant Analysis, v. 23, n. 51, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00103624.2016.1253723>.

CAPÍTULO 3

DIFERENTES AGRUPAMENTOS E EQUAÇÕES PARA ESTIMATIVA DA ÁREA FOLIAR DE GENÓTIPOS DE *Coffea canephora*

RESUMO: O conhecimento das características foliares do cafeeiro é de suma importância, uma vez que está ligado diretamente ao desenvolvimento e manejo da planta. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética e estabelecer modelos matemáticos para estimar a área foliar de 43 genótipos de *Coffea canephora* através de características lineares das folhas. Em uma lavoura compostas pelos distintos genótipos coletou-se folhas do terço médio superior e mediu manualmente o comprimento da nervura central e máxima largura do limbo foliar, posteriormente com medidor de área foliar aferiu a área foliar real (AF). As variáveis foliares comprimento (C), largura (L), área foliar real (AF) e produto comprimento x largura (CL) foram submetidas à análise de correlação de Pearson e agrupados pelo método otimização de Tocher. Foram testadas todas as combinações por modelos lineares conforme os parâmetros existentes e foi ajustado o R^2 e testado o BIC para cada modelo, após a escolha da variável estabeleceu equações considerando os parâmetros β_0 e β_1 , estas foram submetidas a validação cruzada fazendo a comparação entre o valor de área observado x predito. Verificou-se que os 43 genótipos formaram três grupos de acordo com procedimento de Tocher, sendo que um grupo abrangeu 41 genótipos. Maiores correlações linear de Pearson ocorreram entre produto CL e AF, seguido de L e AF, logo, CL estima satisfatoriamente a área foliar do cafeeiro, mas também pode ser adotada a variável largura devido maior facilidade de medição a campo. As equações geradas considerando ambas variáveis foram significativas e a análise de validação cruzada confirmou-se o ajustamento das equações.

PALAVRAS-CHAVE: café conilon, folhas, medidas lineares, método não destrutivo.

DIFFERENT GROUPS AND EQUATIONS FOR ESTIMATION OF THE FOLIAR AREA OF GENOTYPES OF *Coffea canephora*

ABSTRACT: The knowledge of the leaf characteristics of the coffee tree is of great importance, since it is directly linked to the development and management of the plant. The objective of this work was to evaluate the genetic diversity and to establish mathematical

models to estimate the leaf area of 43 genotypes of *Coffea canephora* through linear characteristics of the leaves. In a crop composed of the distinct genotypes leaves were collected from the upper middle third and manually measured the length of the central vein and maximum width of the leaf limb, later with a leaf area gauge measured the actual leaf area (LA). The leaf length (L), width (W), real leaf area (LA) and length x width (LW) were submitted to Pearson correlation analysis and grouped by the Tocher optimization method. All combinations were tested by linear models according to the existing parameters and the R^2 was adjusted and the BIC was tested for each model, after choosing the variable established equations considering the parameters β_0 and β_1 , which were submitted to cross-validation by comparing the observed area value x predicted. It was verified that the 43 genotypes formed three groups according to the Tocher procedure, and one group comprised 41 genotypes. Larger Pearson linear correlations occurred between LW and LA, followed by W and LA, therefore, LW satisfactorily estimates the leaf area of the coffee tree, but also can be adopted the variable width due to greater ease of field measurement. The equations generated considering both variables were significant and the cross-validation analysis confirmed the adjustment of the equations.

KEY WORDS: conilon coffee, leaves, linear measurements, non-destructive method.

INTRODUÇÃO

Acredita-se que a fotossíntese seja a reação fotoquímica mais importante durante a qual a luz é convertida em energia biológica em plantas (WANG et al., 2018). A área foliar está totalmente vinculada a este processo, pois a eficiência fotossintética depende da taxa de fotossíntese por unidade de área foliar e da interceptação da radiação solar, que são influenciadas pela arquitetura do dossel e pela dimensão da folha (FAVARIN et al., 2002; PARTELLI et al., 2006; FASCELLA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013), assim, a área foliar se caracteriza como um dos mais importantes parâmetros na avaliação do crescimento e rendimento vegetal.

O conhecimento sobre a área foliar possui diversas aplicabilidades agronômicas, como a estimativa da perda de água por transpiração e escolha do método de irrigação adequado de acordo com a exigência da planta; seleção da cultivar, localidade da área de plantio e manejo empregado no cultivo; cálculos de dosagens para aplicações de produtos foliares como fungicidas, inseticidas e adubos, determinação de danos bióticos e abióticos;

qualidade e produção final das culturas (PARTELLI et al., 2006; BUSATO et al., 2010; ESPINDULA et al., 2018).

A medida da área foliar pode ser feita de forma direta destrutiva ou não, e indireta não destrutiva (PARTELLI et al., 2006, 2007; BUSATO et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2013). Para determinar a área foliar diretamente, as folhas são recolhidas da planta, caracterizando o método como destrutivo e de elevada mão de obra. Já a medição de forma direta não destrutiva é mais simples, mas demanda equipamentos onerosos, enquanto que os métodos indiretos não destrutivos permitem avaliações sucessivas em uma mesma planta e agilidade nas avaliações, além de ser de baixo custo e mão de obra não necessariamente especializada (BUSATO et al., 2010; ILKAEI et al., 2011; TOEBE et al., 2012; SCHMIDT et al., 2014).

O método indireto não destrutivo se baseia na estimativa da área foliar mediante medição dos parâmetros de largura e comprimento da folha ainda na planta (SCHMIDT et al., 2016; ESPINDULA et al., 2018), e a partir disso faz-se a adoção de modelos estatístico. As equações de regressão entre a área foliar real (AFR) e os parâmetros dimensionais das folhas têm boa precisão e baixo custo, eliminando a necessidade de medidores caros ou a realização de demoradas reconstruções geométricas (SCHMIDT et al., 2014; BRINATE et al., 2015ab).

Estudo de Partelli et al. (2006) propuseram um modelo de equação para o cafeeiro conilon considerando o comprimento da nervura central, no qual gerou duas equações de acordo com a idade da planta, jovem e adulta. Entretanto, devido grande variabilidade genética existente em *C. canephora* (COVRE et al., 2016; ESPINDULA et al., 2018) a revalidação desses métodos torna-se necessário ao longo do tempo. Pois, a disponibilidade de novos genótipos e suas inúmeras características morfológicas distintas pode alterar o nível de precisão dos métodos que foram feitos a partir da área foliar dos antigos genótipos (BRINATE et al., 2015ab). Espindula et al. (2018) comprovou isto ao testar a eficiência da equação desenvolvida por Partelli et al. (2006) em 15 genótipos de cafeeiros robustas, concluindo que deve ser ajustadas para cada genótipo devido suas características foliares dissimilares.

A forma da folha é uma característica morfológica individual, dependente da relação entre o comprimento e largura e da quantidade de recortes na borda do limbo foliar, assim tem a necessidade da elaboração de modelos específicos de estimação da área foliar para cada espécie vegetal (CARGNELUTTI et al., 2015) e até mesmo dentro da mesma espécie para as diferentes cultivares. Além disso, cada folha, dependendo do grau de diferenciação ou da espécie, tem a capacidade de reagir a mudanças em seu habitat, alterando metabolismo,

anatomia e morfologia, a fim de manter a eficiência fotossintética (RODRIGUES et al., 2016; MARTINS et al., 2016; ESPINDULA et al., 2018).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo estudar a diversidade genética da área foliar de 43 genótipos de cafeeiro e obter equações matemáticas, ou seja, um fator de correção que através de parâmetros lineares dimensionais das folhas, permita estimar a área foliar dos distintos genótipos.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em uma lavoura composta por 43 genótipos de *C. canephora* selecionados por cafeicultores da região, inéditos em pesquisa científica. O plantio ocorreu em abril de 2014 no município de Nova Venécia, região norte do Estado do Espírito Santo, Brasil, em uma propriedade particular localizada a uma latitude 18°66'23" sul e longitude 40°43'07" oeste, altitude de 50 metros, temperatura média anual é de 23 °C. A região possui clima tropical, caracterizado pelo verão quente e úmido, e inverno seco, classificado como Aw, de acordo com Köppen (ALVARES et al., 2013).

Os genótipos foram dispostos em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições, sendo os tratamentos constituídos pelos diferentes genótipos, e cada unidade experimental contém sete plantas. O plantio foi realizado no espaçamento de 3 metros entre linhas e 1 metro entre plantas, o que equivale a 3333 plantas por hectare. Dos 43 genótipos implantados 42 foram propagados por estaquia e um por semente, as quais foram conduzidas com quatro hastes por planta e toda área experimental possui irrigação por sistema de gotejamento.

Para determinação da área foliar coletou-se folhas do terceiro ou quarto par recém-desenvolvidas, de ramos plagiotrópicos situados no terço médio das plantas, num total de 20 folhas por genótipo. As folhas foram colocadas em sacos devidamente identificados e acondicionadas em caixa térmicas para evitar a perda de água, em seguida encaminhadas ao laboratório. Realizou-se a mensuração das folhas com auxílio de régua graduada, aferindo o comprimento da nervura central e a máxima largura do limbo foliar em centímetros (PARTELLI et al., 2006). Posteriormente, foi feita a determinação da área foliar (AF) por meio do medidor de área foliar Modelo LI-3100, LI-COR, Lincoln, NE, USA. Essas avaliações foram realizadas em duas épocas distintas, outubro de 2016 e fevereiro de 2017.

As variáveis foliares: comprimento (C) em cm, largura (L) em cm, área foliar real (AF) em cm² e comprimento x largura (CL) em cm² foram submetidos à análise de correlação linear de Pearson. Para estudo da diversidade genética adotou como medida de

dissimilaridade a matriz de distância generalizada de Mahalanobis (D^2) e o agrupamento foi realizado pelo método otimização de Tocher. Posteriormente, foram testadas todas as combinações de modelos lineares conforme os parâmetros existentes e foi ajustado o R^2 (Coeficiente de determinação) e testado o BIC (Critério de Informação Bayesiano ou Critério de Schwarz) para cada modelo, estes foram plotados em diagrama. Após a seleção da variável que melhor estimou a área foliar foram descritas as equações/modelos matemáticos estatísticos considerando os parâmetros β_0 e β_1 , de acordo com os agrupamentos de Tocher. Com base no modelo selecionado realizou-se a validação cruzada do modelo por meio da comparação entre o valor de área observado x predito. Todas as análises foram feitas com auxílio do programa R (R Core Team, 2018) e dos pacotes leaps (LUMLEY, 2017) e MASS (VENABLES e RIPLEY, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente as medições foliares foram realizadas em duas épocas distintas como especificado nos materiais e métodos, entretanto ao proceder com as análises verificou-se que os resultados obtidos para ambas as avaliações foram muito similares, isto para correlação linear de Pearson, agrupamento de Tocher, Coeficiente de determinação e BIC, com isso optou-se por trabalhar os dados unificados e não separados.

Realizou-se à análise de correlação de Pearson a fim de verificar o grau de relação entre as variáveis aferidas (Tabela 1). O estudo da correlação fornece a informação de que traços fortes são geneticamente associados uns aos outros (BIKILA e SAKIYAMA, 2017), possibilitando avaliar o quanto a alteração em uma variável pode afetar as variáveis correlacionadas. Variáveis correlacionadas positivamente indicam que ambas são beneficiadas ou prejudicadas pelas mesmas causas de variações ambientais, correlações com valores negativos indicam que o ambiente favorece um caráter e desfavorece o outro (SILVA et al., 2016).

Tabela 1. Correlação Linear de Pearson entre as variáveis foliares comprimento (C), largura (L), área foliar (AF) e comprimento x largura (CL) de 43 genótipos.

	Comprimento (C)	Largura (L)	Área Foliar (AF)	CL
Comprimento (C)	1	0,63	0,82	0,85
Largura (L)	**	1	0,95	0,94
Área foliar (AF)	**	**	1	0,99
CL	**	**	**	1

** são significativos ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t.

Devore (2006) classifica os valores de 0,00 a 0,19 como correlação bem fraca; 0,20 a 0,39 como correlação fraca; 0,40 a 0,69 como correlação moderada; 0,70 a 0,89 como correlação forte; 0,90 a 1,00 como correlação muito forte. Nota-se que todos os coeficientes de correlação evidenciaram associações positivas e fortes. Espindula et al. (2018) também encontrou correlação positiva na magnitude de 0,60 a 0,94 entre as áreas estimadas e reais das folhas para 15 genótipos de café robusta.

As correlações variaram de 0,63 a 0,99, sendo que os menores ocorrem entre o comprimento da folha e os demais parâmetros (0,63 a 0,85). A maior se dá entre área foliar e produto CL (0,99), seguido de largura versus área foliar e CL (0,95 e 0,94) (Tabela 2). Fato este que já demonstra uma possível associação da estimação da área foliar aferindo o comprimento e a largura (CL) com a medição baseando-se no equipamento usualmente adotado e com elevado grau de precisão.

Como a proposta é diminuir mão de obra e não destruir as amostras, provavelmente a medição da largura de folhas seja eficaz para determinação da área foliar dos distintos genótipos, uma vez que o valor de correlação entre largura e AF foi de 0,95, sendo bastante satisfatório e eficiente. Esses resultados diferem em alguns aspectos de Partelli et al. (2006) que obtiveram coeficientes de correlação linear de Pearson maiores para comprimento do que para largura da folha, mas corroboram com os coeficientes de correlação mais elevados entre área foliar e CL. Estas diferenças observadas entre os respectivos estudos podem estar ligado em decorrência de o presente trabalho ter analisado diferentes genótipos, já o trabalho de Partelli e colaboradores fez estimativas com base em apenas um material genético. Sendo assim, empiricamente pode-se informar que a variação entre os genótipos está mais relacionada ao comprimento do que a largura da folha, ou seja, diferentes comprimentos para os diferentes materiais genéticos sob avaliação, resposta importante que deve ser até mais estudada em trabalhos posteriores como forma de diferenciação de cultivares e suas respectivas identificações a campo.

Para verificar a similaridade e agrupamento dos genótipos com menor divergência genética quanto às características foliares estimadas, procedeu-se com o método de otimização de Tocher (Tabela 2), que se baseia na formação do primeiro grupo com o par de indivíduos com maior similaridade fundamentados na matriz de dissimilaridade calculada pelo método de Mahalanobis. A partir desta, é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos, adotando-se o critério de que a distância média intragrupo deve ser menor que a distância média intergrupo (CRUZ et al., 2011). Os genótipos dividiram-se em três grupos,

concentrando 41 genótipos no grupo 1, e os outros dois grupos foram composto pelos genótipos 2 e 4, respectivamente.

Tabela 2. Agrupamento dos 43 genótipos de *Coffea canephora* pelo método de otimização de Tocher.

Grupo	Genótipos														
	1	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
			33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43		
2															
3															

O método de agrupamento Tocher foi empregado por Fonseca et al. (2006) quando avaliou 32 clones que compõe três variedades clonais formando três grupos; também por Ivoglo et al. (2008) com 21 progênies de meios-irmãos dividindo em quatro grupos; e por Covre et al. (2016) e Giles et al. (2018) com 34 e 30 genótipos promissores, no qual obtiveram oito e três grupos, respectivamente.

Importante ressaltar que essa discriminação entre grupos de genótipos mais homogêneos dentro dos grupos é necessária, pois os genótipos de *C. canephora* apresentam dissimilaridade fenotípica, se diferindo quanto ao crescimento, morfologia, características foliares e copa. Portanto, agrupá-los quanto às diferenças na área foliar pode aumentar a eficiência dos modelos propostos para estudar sua área foliar (Brinate et al., 2015a). Logo, nota-se que os genótipos dois e quatro são bastante divergentes dos demais, pois se mantiveram em grupos isolados, evidenciando que há variabilidade genética dentro da população estudada, isso é uma propriedade marcante da espécie *C. canephora* devido ao modo de reprodução ser por alogamia e possuir autoincompatibilidade entre alguns alelos. Além disso, as folhas se modificam frente ao ambiente que são expostas, alterando sua área, espessura, forma, concentração de nutrientes e capacidade de trocas gasosas, ajustando-as de acordo com a fotossíntese líquida e garantindo uma alta condutância hidráulica (Gama et al., 2017; Brinate et al., 2015b). Os demais 41 genótipos que se mantiveram no mesmo grupo são similares para as características foliares, fato este que contribui para a obtenção de um único modelo para a predição da área foliar para a população e este modelo deve ter uma precisão alta da estimação dos parâmetros desejados.

Com base nas características avaliadas, foram testadas todas as combinações de modelos conforme os parâmetros existentes e ajustados o R^2 (Coeficiente de determinação) e testado o BIC (Critério de Informação Bayesiano ou Critério de Schwarz) para cada modelo.

Esse processo foi realizado considerando os agrupamentos de Tocher e também os 43 genótipos como um todo (Figuras 1). O coeficiente de determinação (R^2) é uma medida de ajustamento de um modelo estatístico linear generalizado, como a regressão linear, em relação aos valores observados, com espaço paramétrico entre 0 e 1, indicando em percentagem o quanto o modelo se ajustou aos valores observados e explica os estimados para os parâmetros. Quanto maior o R^2 , mais explicativo é o modelo, melhor ele se ajusta à amostra (CHARNET et al., 1999; LEVINE et al., 2000). O Critério Bayesiano de Schwarz (BIC) tem como pressuposto a existência de um “modelo verdadeiro” que descreve a relação entre a variável dependente e as diversas variáveis explanatórias entre os diversos modelos sob seleção. Assim, é definido como a estatística que maximiza a probabilidade de se identificar o verdadeiro modelo dentre os avaliados. O modelo com menor BIC, ou seja, mais negativo é considerado o de melhor ajuste (SCHWARZ, 1978).

Além disso, a seleção do modelo com os mesmo valores de BIC tem-se como escolha o modelo com menor grau de parametrização, ou seja, com menor número de caracteres de causa de efeitos indiretos associados aos parâmetros de efeitos diretos.

Na figura 1 encontram-se os valores de R^2 e BIC para todos os contrastes testados. De modo geral a variável resultante do produto CL foi a que melhor representa a estimativa de área foliar (Figura 1), sendo que quando estimado sem agrupamento (total) apresentou R^2 de 0,95 e BIC -1900, para o agrupamento 1 (G1) ocorreu R^2 de 0,94 e BIC -1600, no agrupamento 2 (G2) o valor de R^2 é de 0,92 e BIC -65 e no grupo 3 (G3) possui R^2 de 0,91 e BIC -64.

A adoção da variável CL predomina nos melhores ajustes em relação aos demais, com R^2 mais satisfatórios e BIC mais baixos. É possível ter R^2 mais elevados e BIC mais negativos, ou seja, uma equação mais ajustada, mas para isso tem que ser considerado mais variáveis, o que torna uma equação super parametrizada, ou seja, necessita de maior número de parâmetros para obter um maior grau de confiabilidade. Além disso, torna o trabalho menos prático e eficiente. Estes resultados corroboram com Schmidt et al. (2014) que ao estudar a área foliar das variedades Catuaí e Catuaí vermelho verificou que as equações obtidas com os modelos lineares e circunscrito a partir de CL apresentaram os valores mais elevados de R^2 . Similarmente, Antunes et al. (2008) concluíram que o melhor ajuste é pelo método potência, a partir de medidas de CL como variável independente.

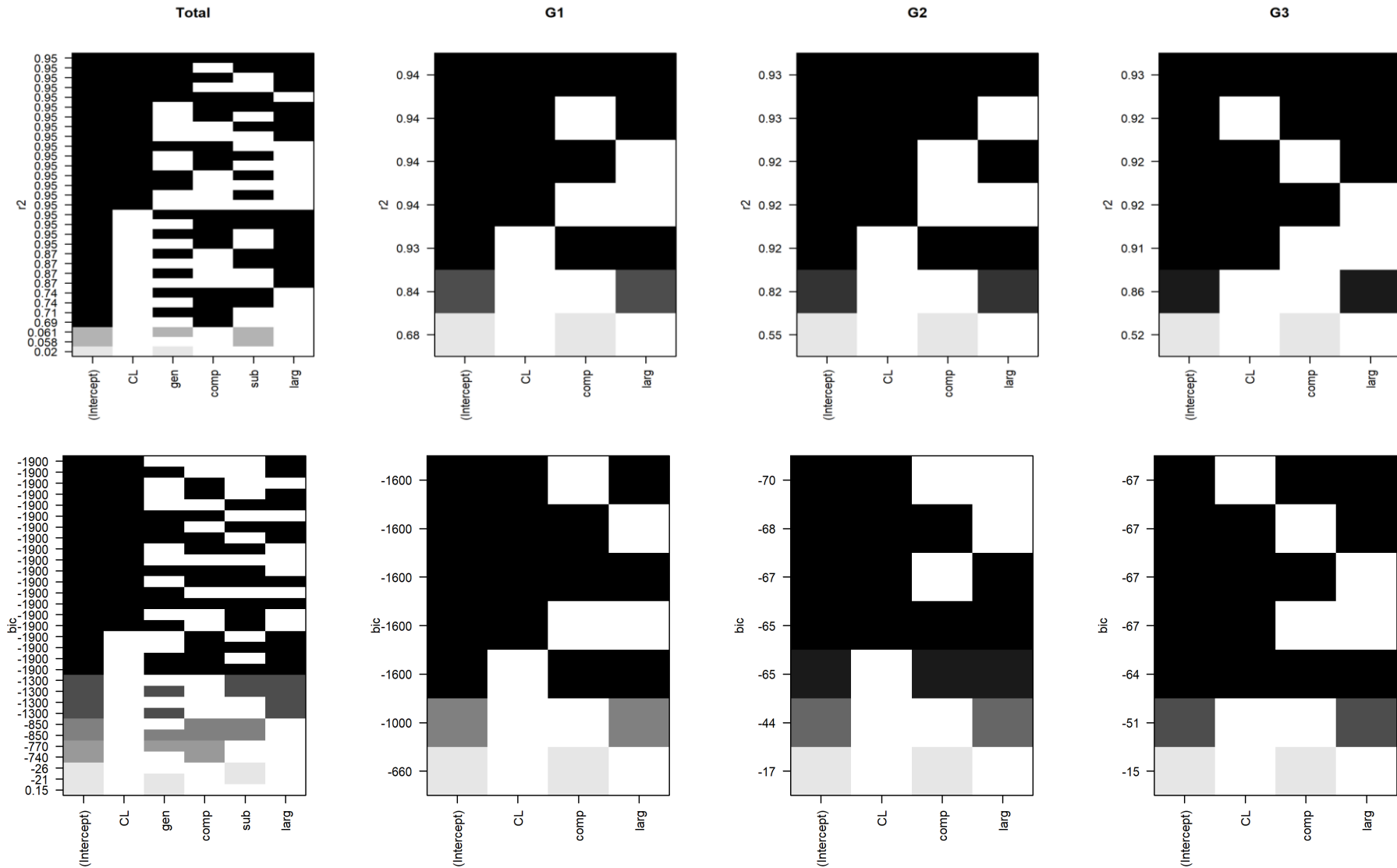


Figura 1. Valor de R^2 (Coeficiente de determinação) e BIC (Critério de Informação Bayesiano) para os diferentes modelos.

Em feijão guandu, Cargenelutti Filho et al. (2015) verificou que os modelos quadrático, potência e linear de Y, em função do produto do comprimento x largura do limbo do folíolo central (CFC×LFC), são adequados para a estimação da área foliar determinada por fotos digitais. A área foliar das plantas de berinjela foi mais bem estimada pelos modelos que utilizaram conjuntamente as medidas de comprimento e largura (HINNAH et al., 2015).

Se considerarmos apenas a variável largura da folha obtém-se valores de ajustes de R² de 0,87; 0,84; 0,82 e 0,86, e BIC de -1300, -1000, -44 e -51, para “todos”, G1, G2 e G3, respetivamente. Estes, não são os coeficientes mais altos e BIC mais negativos, como relatado à cima a estimativa de CL fornece melhor ajuste, mas diante da dificuldade de avaliação de muitos parâmetros a campo, pode ser a alternativa mais viável por ser mais rápida e de maior custo benefício.

Para feijão de vagem, Toebe et al. (2012) relataram que os modelos quadrático e de potência em função da largura do folíolo central são adequados para estimar a área foliar completa, obtida por meio do método de fotos digitais. Similarmente para o girassol, Maldaner et al. (2009) verificou que a largura da folha melhor estimou a área foliar e ainda concluiu que esta variável está sujeita a um menor erro experimental do que o comprimento da folha. Ambos relatam que os modelos que utilizam somente a largura (L) ou o comprimento (C) são preferíveis, por utilizarem apenas uma das dimensões da folha. Com isso, há uma redução em 50% no número de medições de dimensão linear a serem realizadas a campo.

Após a seleção das variáveis CL e Largura que melhor estimaram a área foliar dos respectivos genótipos através dos coeficientes de determinação e BIC, foram geradas as equações considerando os β_0 e β_1 , de acordo com os grupos formados pelo método de agrupamento de Tocher, mas também foi estabelecido uma equação sem os agrupamentos designado como total, considerando o produto CL e apenas largura (Tabela 3).

Tabela 3. Equações elaboradas a partir das variáveis escolhidas pelos valores de R² e BIC de acordo com os grupos formados pelo método de otimização de Tocher.

Variáveis	Grupos	Equações
Comprimento x Largura	Total	$Y = -0,815124 + 0,635626 \times CL$ ***
	1	$Y = -0,550712 + 0,632022 \times CL$ ***
	2	$Y = -1,0414 + 0,6425 \times CL$ ***
	3	$Y = -5,62625 + 0,67793 \times CL$ ***
Largura	Total	$Y = -26,5722$ *** + $13,2743 \times L$ ***
	1	$Y = -26,2319$ *** + $13,2754 \times L$ ***
	2	$Y = -11,9575$ ** + $9,2588 \times L$ ***
	3	$Y = -40,046$ *** + $14,735 \times L$ ***

******, ******* significativo ao nível de 1% e 0,1 % pelo teste F.

Seguindo os critérios mencionados acima, no total, foram gerados oito modelos matemáticos diferentes, sendo todos significativos. Como pode ser visto, as equações geradas sem os agrupamentos de Tocher também foram significativas e muito similares ao grupo 1 que abrange 41 genótipos. Isto evidencia que usando esta equação para estimar a área foliar de todos os genótipos pode ser eficiente e seguro, com possibilidade de descartar os agrupamentos.

A comparação entre os valores preditos e observados fornece uma melhor compreensão da precisão em estimar a equação através da adoção destes parâmetros. Considerando a variável CL verificam-se os maiores valores de coeficiente de determinação (R^2), sendo estes 0,95, 0,93, 0,92 e 0,91 para “total” que considera os 43 genótipos, grupo 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 2 e Tabela 4). Correlação positiva também foi encontrada entre as áreas estimadas e reais das folhas para todos os genótipos estudados por Espindula et al. (2018), os valores de r variaram de 0,60 a 0,94.

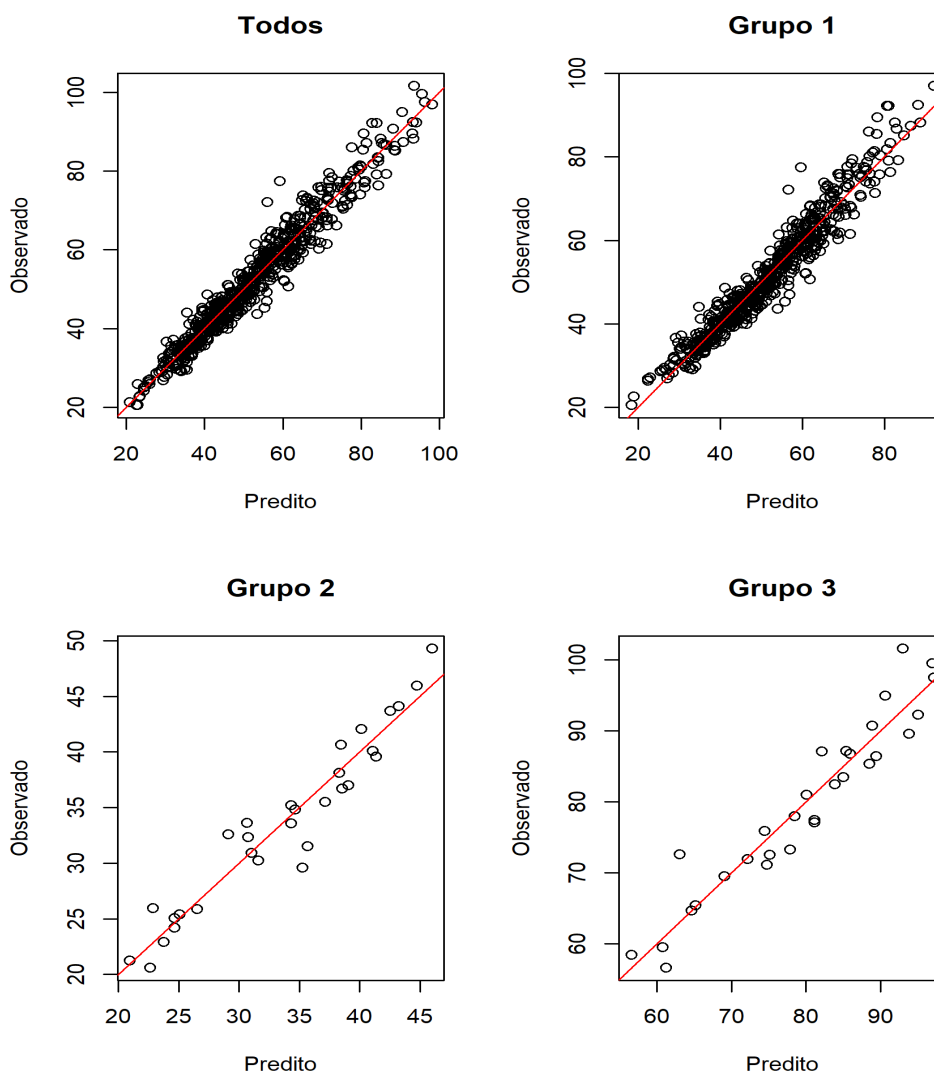


Figura 2. Relação entre o valor predito vs observado de área foliar considerando o produto comprimento x largura (CL).

Considerando a variável largura verificam-se valores de coeficiente de determinação (R^2) de 0,87, 0,84, 0,82 e 0,86 para “todos”, grupo 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 3 e Tabela 4). Logicamente são mais baixos do que quando considerado o produto Comprimento x Largura (Figura 2), entretanto como já foi afirmado acima, em situação de campo é muito mais simples medir apenas uma variável como no caso da largura, logo R^2 entre 0,80 a 0,90 são precisos e podem estimar satisfatoriamente a área foliar dos referidos materiais avaliados.

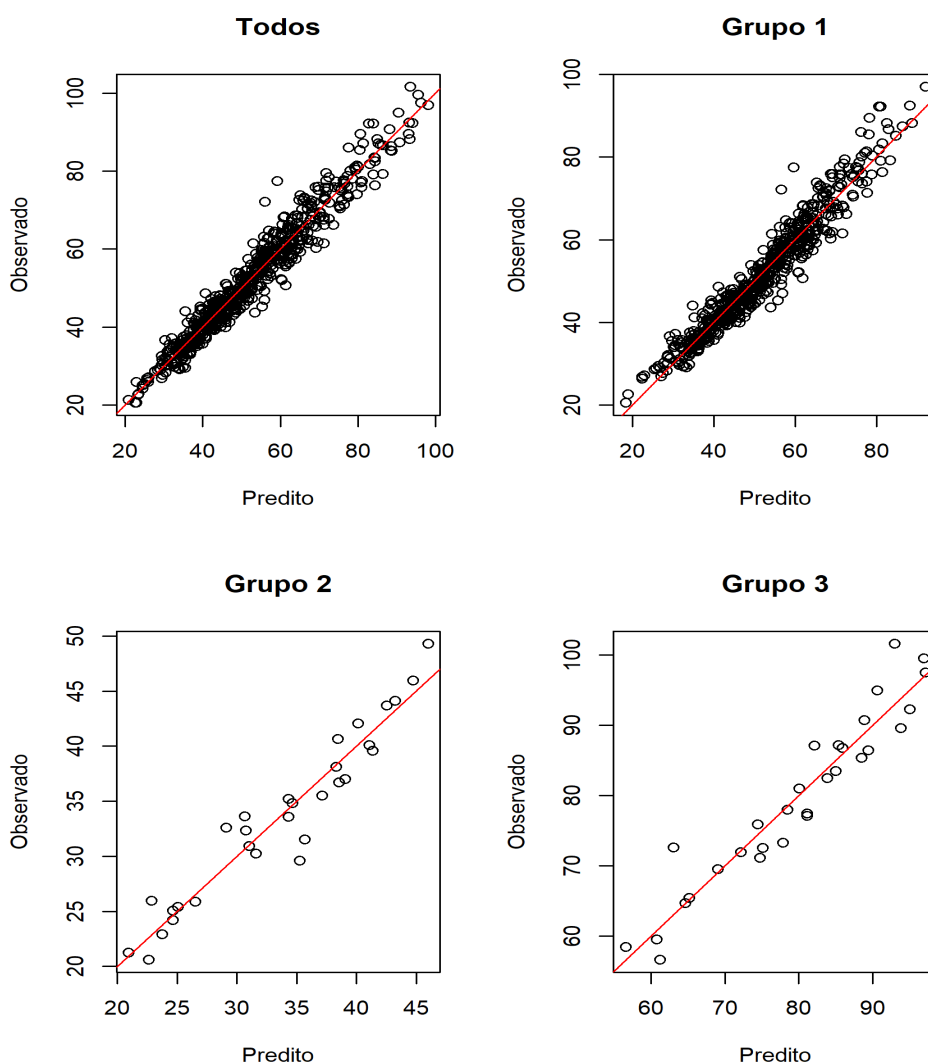


Figura 3. Relação entre valor predito vs observado de área foliar considerando a variável largura de folha (L).

Para verificar a coerência dos coeficientes de determinação, estes foram submetidos ao método de validação cruzada, que é uma técnica para avaliar a capacidade de generalização de um modelo. Esta técnica é amplamente empregada em problemas onde o objetivo da

modelagem é a predição (MARTENS e NAES, 1996). Busca-se então estimar o quão preciso é este modelo na prática, ou seja, o seu desempenho para um novo conjunto de dados (Tabela 4). A validação cruzada forneceu valores muito próximos aos originais e até mesmo maiores em alguns casos como grupo 1, 2 e 3. Estes resultados evidenciam a precisão em estimar a área foliar dos genótipos através da mensuração das variáveis CL e L e elaboração das respectivas equações matemáticas.

Tabela 4. Coeficiente de determinação (R^2) e validação cruzada considerando CL e L.

	Total	G1	G2	G3
	R^2			
CxL	0,95	0,94	0,92	0,91
Largura	0,87	0,84	0,82	0,86
	Validação Cruzada			
CxL	0,95	0,94	0,94	0,94
Largura	0,86	0,86	0,86	0,86

Em vista dos valores de R^2 elevados quando não considerou os agrupamentos, mostra que possivelmente não seja necessário estudar a área foliar dos genótipos separadamente, uma vez que quanto maior valor de R^2 (mais próximo de 1) mais ajustado é o modelo adotado. Brinate et al. (2015) relataram que mesmo com as diferenças entre os genótipos, o padrão de formato da folha permanece semelhante, confirmando a aplicabilidade do método para estimar a área foliar usando dimensões lineares de folhas para genótipos melhorados, sem a ocorrência de perda de precisão, tanto para café Arábica quanto Conilon.

CONCLUSÕES

Os genótipos apresentam variabilidade genética, formando grupos distintos pelo método de Tocher;

Maiores correlações ocorrem entre CL e área foliar, seguido de largura e área foliar;

O produto entre as medidas lineares do comprimento e largura (CL) do limbo foliar estimam satisfatoriamente a área foliar do cafeeiro, mas também pode ser adotada somente a variável largura, devido maior facilidade de medição a campo;

A comparação entre os valores preditos e observados evidenciou o ajustamento das equações, fato comprovado pela validação cruzada.

REFERÊNCIAS

- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- ANTUNES, W.C.; POMPELLI, M.F.; CARRETERO, D.M.; DAMATTA, F.M. Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). *Annals of Applied Biology*, v. 153, p. 33-40, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00235.x>
- BIKILA, B.A.; SAKIYAMA, N.S. Estimation of Genetic Parameters in *Coffea canephora* Var. Robusta. *Advances in Crop Science and Technology*, v. 5, n. 5, p. 1-9, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-8863.1000310>.
- BRINATE, S.V.B.; MARTINS, L.D.; RODRIGUES, W.N.; COLODETTI, T.V.; AMARAL, J.F.T.; TOMAZ, M.A. Accuracy of linear methods to estimate the leaf area of genotypes of conilon coffee. *African Journal of Agricultural Research*, v. 10, n. 30, p. 2955-2960, 2015: DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2014.9336> a
- BRINATE, S.V.B.; RODRIGUES, W.N.; MARTINS, L.D.; COLODETTI, T.V.; TOMAZ, M.A.; AMARAL, J.F.T. Applicability of the Method of Linear Dimensions to Estimate Leaf Area in Improved Genotypes of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *American Journal of Plant Sciences*, v. 6, p. 651-658, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.65070> b
- BUSATO, C.; FONTES, P.C.R.; BRAUN, H.; BUSATO, C.C.M.; Estimativa da área foliar da batateira, cultivar Atlantic, utilizando dimensões lineares. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 4, p. 702-708, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902010000400026>.
- CARGNELUTTI FILHO, A.; TOEBE, M.; ALVES, B.M.; BURIN, C. Estimativa da área foliar de feijão guandu por dimensões foliares. *Ciência Rural*, v. 45, n. 1, p. 1-8, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/01038478cr20140551>
- CHARNET, R.; BONVINO, H.; FREIRE, C.A.L.; CHARNET, E.M.R. Análise de modelos de regressão linear com aplicações. Campinas, SP: Unicamp, 1999.
- COVRE, A.M.; CANAL, L.; PARTELLI, F.L.; ALEXANDRE, R.S.; FERREIRA, A.; VIEIRA, H.D. Development of clonal seedlings of promising Conilon coffee (*Coffea canephora*) genotypes. *Australian Journal of Crop Science*, v. 10, n. 3, p. 385-392, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.03.p7235>
- COVRE, A.M.; CANAL, L.; PARTELLI, F.L.; ALEXANDRE, R.S.; FERREIRA, A.; VIEIRA, H.D. Development of clonal seedlings of promising Conilon coffee (*Coffea canephora*) genotypes. *Australian Journal of Crop Science*, v. 10, n. 3, p.385-392, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.03.p7235>.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620p.
- DEVORE, J.L. Probabilidade e estatística: para engenharia e ciências. São Paulo, SP: Thomson Pioneira, 2006. 706 p.
- ESPINDULA, M.C.; PASSOS, A.M.A.; ARAÚJO, L.F.B.; MARCOLAN, A.L.; PARTELLI, F.L.; RAMALHO, A.R. Indirect estimation of leaf area in genotypes of 'Conilon' coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner). *Australian Journal of Crop Science*, v. 12, n. 6, p. 990-994, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.18.12.06.PNE1090>

- FASCELLA, G.; DARWICH, S.; ROUPHAEL, Y. Validation of a leaf area prediction model proposed for rose. *Chilean Journal of Agricultural Research*, v. 73, n. 1, p. 73-76, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392013000100011>
- FAVARIN, J.L.; DOURADO NETO, D.; GARCÍA Y GARCÍA, A.; VILLA NOVA, N.A.; FAVARIN, M.G.G.V. Equações para a estimativa do índice de Área foliar do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 6, p. 769-773, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2002000600005>
- FONSECA, A.F.A.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D.; SAKAIYAMA, N.S.; FERRÃO, M.Q.G.; FERRÃO, R.G.; BRAGANÇA, S.M. Divergência genética em café conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 4, p. 599-605, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000400008>.
- GAMA, T.C.P.; SALES JUNIOR, J.C.; CASTANHEIRA, D.T.; SILVIERA, H.R.O.; AZEVEDO, H.P.A. Anatomia foliar, fisiologia e produtividade de cafeeiros em diferentes níveis de adubação. *Coffee Science*, v. 12, n. 1, p. 42-48, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v12i1.1195>
- GILES, J.A.D.; PARTELLI, F.L.; FERREIRA, A.; RODRIGUES, J.P.; OLIOSI, G.; LIMA, F.H. Genetic diversity of promising conilon coffee clones based on morpho-agronomic variables. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 2, p. 2437-2446, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170523>.
- GUIMARÃES, M.J.M.; COELHO FILHO, M.A.; PEIXOTO, C.P.; GOMES JUNIOR, F.A.; OLIVEIRA, V.V.M. Estimation of leaf area index of banana orchards using the method LAI-LUX. *Water Resources and Irrigation*, v. 2, n. 2, p. 71-76, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/2.1.3843.1369>
- HINNAH, F.D.; HELDWEIN, A.B.; MALDANER, I.C.; LOOSE, L.H.; LUCAS, D.D.P.; BORTOLUZZI, M.P. Estimativa da área foliar da berinjala em função das dimensões foliares. *Bragantia*, v. 73, n. 3, p. 213-218, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0083>
- ILKAEI, M. N.; PAKNEJAD, F.; ZAVAREH, M.; ARDAKANI, M.R.; KASHANI, A. Prediction model of leaf area in soybean (*Glycine max* L.). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, v. 6, n. 1, p. 110-113, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.3844/ajabssp.2011.110.113>
- IVOGLO, M.G.; FAZUOLI, L.C.; OLIVEIRA, A.C.B.; GALLO, P.B.; MISTRO, J.C.; SILVAROLLA, M.B.; TOMA-BRAGHINI, M. Divergência genética entre progênies de café robusta. *Bragantia*, v. 67, n. 4, p. 823-831, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000400003>.
- LEVINE, D.M.; BERENSON, M.L.; STEPHAN, D. *Estatística; Teoria e aplicações*. Rio de Janeiro, LTC, 2000.
- MALDANER, I.C.; HELDWEIN, A.B.; LOOSE, L.H.; LUCAS, D.D.P.; GUSE, F.I.; BORTOLUZZI, M.P. Modelos de determinação não-destrutiva da área foliar em girassol. *Ciência Rural*, v. 39, n. 5, p. 1356-1361, 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000500008>
- MARTENS, H.; NAES, T. *Multivariate Calibration*. John Wiley e Sons, New York, 1996.
- MARTINS, M.Q.; RODRIGUES, W.P.; FORTUNATO, A.S.; LEITÃO, A.E.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SILVA, M.J.; REBOREDO, F.H.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.;

- LIDON, F.J.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *Coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*, v. 29, p. 947-964, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00947>
- PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; DETMANN, E.; CAMPOSTRINI, E. Estimativa da área foliar do cafeeiro conilon a partir do comprimento da folha. *Ceres*, v. 53, n. 306, p. 204-210, 2006.
- PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; VIANA, A.P. Estimative of Black Pepper leaf area with basis on the leaf blade linear dimension. *Ciência Rural*, v. 37, n. 5, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000500039>
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RODRIGUES, W.P.; MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.S.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; SIMÕES-COSTA, M.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; COLWELL, F.; GOULAO, L.; MÁGUAS, C.; MAIA, R.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Global Change Biology*, v. 22, p. 415-431, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/gcb.13088>
- SCHMILDT, E.R.; AMARAL, J.A.T.; SCHMILDT, O.; SANTOS, J.S. Análise comparativa de equações para estimativa da área foliar em cafeeiros. *Coffee Science*, v. 9, n. 2, p. 155-167, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v9i2.573>.
- SCHMILDT, E.R.; NEGRIS, F.S.; CESANA JÚNIOR, E.; SCHMILDT, O.; ALEXANDRE, R.S. Equações para estimar área foliar de maracujá amarelo. *Nucleus*, v. 13, n. 1, p. 97-104, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3738/1982.2278.1461>
- SCHWARZ, G. Estimating the Dimension of a Model. *The Annals of Statistics*, v. 6, n. 2, p. 461-464, 1978.
- SILVA, C.A.; SCHMILDT, E.R.; SCHMILDT, O.; ALEXANDRE, R.S.; CATTANEO, L.F.; FERREIRA, J.P.; NASCIMENTO, A.L. Correlações fenotípicas e análise de trilha em caracteres morfoagronômicos de mamoeiro. *Revista Agro@mbiente On-line*, v. 10, n. 3, p. 217-227, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v10i3.3021>
- THOMAS LUMLEY based on Fortran code by Alan Miller (2017). leaps: Regression Subset Selection. R package version 3.0. <https://CRAN.R-project.org/package=leaps>
- TOEBE, M.; CARGNELUTTI FILHO, A.; LOOSE, L.H.; HELDWEIN, A.B.; ZANON, A.J. Área foliar de feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) em função de dimensões foliares. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 1, p. 2491-2500, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33Supl1p2491>
- VENABLES, W.N.; RIPLEY, B.D. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York, 2002. ISBN 0-387-95457-0.
- WANG, Q.L.; CHEN, J.H.; HE, N.Y.; GUO, F.Q. Metabolic Reprogramming in Chloroplasts under Heat Stress in Plants. *International Journal of Molecular Science*, 2018, 19, 849; doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030849>.

CAPÍTULO 4

IMPACTOS DO AUMENTO DE TEMPERATURAS E DÉFICIT HÍDRICO NA MAQUINÁRIA FOTOSSINTÉTICA DE *Coffea spp.*

RESUMO: O calor e a seca são os principais estresses abióticos que limitam o crescimento das plantas e a produtividade das culturas, e a sua ocorrência conjunta tende a agravar os níveis de estresse. Num contexto de crescente preocupação com as alterações climáticas, e do aumento da frequência da presença simultânea de múltiplos estresses, nomeadamente devido ao aquecimento global e alterações de disponibilidade hídrica, e devido à importância da cafeicultura a nível mundial (em particular na região tropical), levaram-se a cabo estudos com plantas pertencendo a duas cultivares das principais espécies produtoras: *C. arabica* L. cv. Icatu e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153). Estas plantas foram submetidas a duas condições hídricas: bem regado (Ctl) e seca severa (SD) em condições adequadas de temperatura (25/20°C, dia/noite), após o que foram expostas a temperaturas supra-ótimas crescentes até 42/30 °C, e um período de recuperação de 14 dias (Rec14), após o reestabelecimento de condições favoráveis de água (por rega) e temperatura (25/20 °C). Neste contexto, foram avaliados parâmetros foliares relacionados com características estomáticas, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, transporte tilacóidal de elétrons, permeabilidade de membrana e atividades de enzimas da fotossíntese. Valores de potencial hídrico revelaram que estresse hídrico chegou a escala severa (-4,47 e -4,60 MPa em CL153 e Icatu, respectivamente), conseqüentemente diminuiu o conteúdo de água na folha, independente da temperatura. Modificações das características estomáticas foram promovidas pela seca e temperatura dependentes da espécie. De modo geral, as plantas bem regadas toleraram razoavelmente temperaturas supra-ótimas até 37/28 °C para a maioria dos parâmetros avaliados (e até 39/30 °C) nalguns deles), mas maiores impactos são vistos em 42/30 °C, expressos, por exemplo, pelo aumento de F_o e diminuição em F_v/F_m . A seca afetou todos os parâmetros de trocas gasosas, diminuindo P_n , g_s , E , A_{max} e aumentando C_i . A imposição conjunta dos estresses tendencia um agravamento no nível de estresse, embora alguns parâmetros não sejam modificados (A_{max} em CL153), assim, a atividade das enzimas da fotossíntese ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e ribulose-5-fosfato cinase (Ru5PK), bem como dos fotossistemas para os níveis físico (captura de energia) e fotoquímico (transporte de elétrons) foram diminuídos com a imposição simultânea de seca e calor. Os fotossistemas foram impactados, mas protegidos por mecanismos fotoprotetores, como reflectido no aumento dos valores de $Y_{(NPQ)}$ e q_N , mitigando a fotoinativação, como se

pode inferir pela manutenção de $Y_{(NO)}$. Boa capacidade de recuperação foi vista para alguns parâmetros após reestabelecimento das condições normais de água e temperatura para maioria dos parâmetros, evidenciando capacidade de resiliência do cafeeiro frente às condições ambientais estressantes, embora com a manutenção de alguma afetação (por exemplo, o funcionamento dos fotossistemas e transportadores de elétrons). No geral, nossos resultados mostram a tolerância dos cafeeiros a temperaturas bem acima do ótimo para a cultura, mas a sobreposição de calor a seca aumenta o nível de danos, entretanto é visto a atuação de mecanismo de proteção e capacidade resiliente de recuperação após período considerado pequeno de boas condições. Logo, no que se refere às alterações climáticas há possibilidades de não ser tão catastróficas como estimado anteriormente.

PALAVRAS-CHAVE: alterações climáticas, aquecimento global, café, calor, fotoinibição, fotossíntese, seca.

IMPACTS OF TEMPERATURE INCREASE AND HYDRICAL DEFICIT IN THE PHOTOSYNTHETIC MACHINERY OF *Coffea* spp.

ABSTRACT: Heat and drought are the main abiotic stresses that limit plant growth and crop productivity, and their joint occurrence tends to aggravate stress levels. In a context of increasing concern about climate change, and the increasing frequency of simultaneous multiple stresses, in particular due to global warming and changes in water availability, and the importance of coffee growing globally (particularly in the tropical region), studies with plants belonging to two cultivars of the main producing species were carried out: *C. arabica* L. cv. Icatu and *C. canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153). These plants were submitted to two water conditions: well watered (WW) and severe dry (SD) under appropriate temperature conditions (25/20 °C, day/night), after which they were exposed to increasing supra-optimal temperatures up to 42/30 °C, and a recovery period of 14 days (Rec14), after reestablishment of favorable water conditions (by watering) and temperature (25/20 °C). In this context, leaf parameters related to stomatal characteristics, gas exchange, chlorophyll a fluorescence, thylakoidal electron transport, membrane permeability and photosynthesis enzyme activities were evaluated. Values of water potential revealed that water stress reached the severe scale (-4.47 and -4.60 MPa in CL153 and Icatu, respectively), consequently decreasing the leaf water content, regardless of temperature. Modifications of the stomatal characteristics were promoted by species-dependent drought and temperature. In

general, well-watered plants tolerably tolerated supra-optimal temperatures up to 37/28 °C for most of the evaluated parameters (and up to 39/30 °C) in some of them), but higher impacts are seen at 42/30 °C, expressed, for example, by increase of F_o and decrease in F_v/F_m . Drought affected all the parameters of gytanous changes, decreasing P_n , g_s , E , A_{max} and increasing C_i . The joint imposition of the stresses tends to increase in the level of stress, although some parameters are not modified (A_{max} in CL153), thus, the activity of photosynthetic ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) and ribulose-5-phosphate kinase (Ru5PK) photosynthesis enzymes, as well as photosystems for the physical (energy capture) and photochemical (electron transport) levels were diminished with the simultaneous imposition of drought and heat. The photosystems were impacted, but protected by photoprotective mechanisms, as reflected in the increase of the values of $Y_{(NPQ)}$ and qN , mitigating the photoinitiation, as can be inferred by the maintenance of $Y_{(NO)}$. Good recovery capacity was seen for some parameters after reestablishment of the normal water and temperature conditions for most parameters, evidencing coffee resilience capacity in front of the stressful environmental conditions, although with the maintenance of some affectation (for example, the functioning of photosystems and electronic conveyors). In general, our results show the tolerance of the coffee trees at temperatures well above the optimum for the crop, but the overlap of heat to the drought increases the level of damages, however it is seen the performance of a protection mechanism and resilient recovery capacity after the period considered small in good condition. So, with regard to climate change there are possibilities of not being as catastrophic as previously estimated.

KEY WORDS: climate change, global warming, coffee, heat, photoinhibition, photosynthesis, drought.

INTRODUÇÃO

A emissão e a concentração de CO₂ na atmosfera intensificaram-se em meados do século XVIII a partir da revolução industrial. Desde então, com cerca de 280 μL CO₂ L⁻¹ aumentou de forma constante até 384 μL CO₂ L⁻¹ em 2009, ultrapassando 400 μL CO₂ L⁻¹ em 2014, e estima-se que possa vir a atingir entre 730 e 1020 μL CO₂ L⁻¹ em 2100 (IPCC, 2014; DAMATTA et al., 2010, 2016; RAMALHO et al., 2013; SANTOS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016). Além do CO₂, outros gases como N₂O e CH₄ contribuem diretamente com 1/3 das emissões, intensificados pelo manejo impróprio das lavouras e

pastagens (VAN BEEK et al., 2010). Como consequência do aumento da concentração na atmosfera de gases com efeito de estufa, há uma parte crescente da radiação solar que é impedida de ser dissipada de volta para o espaço (RAKOCEVIC et al., 2016), ocasionando o aumento da temperatura do ar. Até 2100 é previsto um aumento que poderá situar entre 1,4 e 5,8 °C (IPCC, 2014), alterando a distribuição inter e intra-anual da precipitação, com períodos prolongados de seca e/ou com excesso de precipitação. Atualmente a seca é ponderada como uma das principais ameaças à produção agrícola mundial, com sérias estimativas de aumento nos próximos 30 anos (MISHRA et al., 2016; ZARGAR et al., 2017; MARTINS et al., 2018; SEMEDO et al., 2018).

As alterações climáticas ameaçam diretamente a sustentabilidade da agricultura (XU et al., 2013; BEACH et al., 2015; TACK et al., 2015), pois as plantas necessitam de condições adequadas para expressar seu potencial de produção, em quantidade e qualidade (ZULLO et al., 2011; TOZZI e GHINI, 2016). Estima-se que até 2050 a população mundial chegará a cerca de 8000 milhões de pessoas, havendo a necessidade de aumento na produção de alimentos em 70%, comprometendo a segurança alimentar mundial (DAMATTA et al., 2010).

O estudo dos estresses abiótico em plantas avançou consideravelmente nos últimos anos. No entanto, a sua maioria tem-se concentrado em condições individuais de estresses, sendo que na realidade do campo tensões distintas podem ocorrer simultaneamente, como no caso de seca e calor (DAMATTA e RAMALHO 2006; JIANG et al., 2016; DUBBERSTEIN et al., 2018). Quando examinado o efeito da combinação de seca e estresse por calor sobre o crescimento e a produtividade de algumas culturas agrícolas ficou provado o aumento do efeito prejudicial em comparação com cada um das diferentes tensões aplicadas individualmente (BARNABÁS et al., 2008; JIN et al., 2016). Desta forma, estudos com a exposição das plantas a limitações ambientais simultâneas são indispensáveis para elucidar o comportamento futuro das culturas em condições de campo.

A ocorrência de temperaturas elevadas podem modificar a capacidade de uso da energia solar, alterar a difusão do gás no mesófilo foliar (LAMBERS et al., 2008), a composição e conteúdo dos pigmentos fotossintéticos (HALDIMANN e FELLER, 2004), afetar as relações hídricas e a demanda por evaporação, a fluidez e a estabilidade das membranas, assim como a síntese e ação de hormônios e o teor de metabólitos primários e secundários (WAHID et al., 2007). Implicações sobre o equilíbrio na nutrição mineral foram igualmente reportados (MARTINS et al., 2014). Com um leque tão alargado de efeitos potenciais, as temperaturas elevadas poderão afetar a fotossíntese e os demais processos fisiológicos fundamentais e, em última análise, a homeostase celular (LONG et al., 2006;

SUZUKI e MITTLER, 2006; KIRSCHBAUM, 2011). Muitos destes impactos sobre o metabolismo celular são igualmente observados sobre estresse hídrico.

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (*ROS*) é um dos principais efeitos nocivos dos estresses térmico (SUZUKI e MITTLER, 2006; HASANUZZAMAN et al., 2013; MARTINS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016), e hídrico, neste caso devido ao aumento da energia que não é gasta pelo processo fotossintético devido à redução da abertura estomática (DAMATTA e RAMALHO, 2006). O aumento descontrolado de *ROS* pode causar danos oxidativos nos múltiplos componentes celulares, incluindo nos cloroplastos (por exemplo, na proteína D1, lipídios), RNA e DNA, promovendo impactos ao nível estrutural e metabólico, que podem inclusivamente resultar em morte celular (NOCTOR et al., 2014; MENEZES-SILVA et al., 2017; YANG et al., 2018).

A cultura do cafeeiro é sensível às condições adversas do clima, sendo os estresses por calor e seca os mais temidos, pois afetam severamente o crescimento, desenvolvimento, e produtividade (DAMATTA e RAMALHO, 2006; OVALLE-RIVERA et al., 2015; SEMEDO et al. 2018; DAMATTA et al., 2018; 2019). Estudos por meio de modelos preveem reduções de área global apropriada para cultivo em cerca de 50% (BUNN et al., 2015; OLLAVE-RIVERA et al., 2015), inclusive no Brasil e Vietnã (ASSAD et al., 2004; ZULLO et al., 2006, 2011), perdas de produção no México, Nicarágua e Tanzânia (GAY et al., 2006; SCHROTH et al., 2009; RAHN et al., 2013; CRAPARO et al., 2015), significativa extinção de populações selvagens de *C. arabica* (DAVIS et al., 2011; 2019). Para além a qualidade do produto pode ser alterada negativamente, pois a composição química do grão e dos precursores responsáveis pelas suas características de sabor, aroma, acidez, amargor após a torrefação é afetada pelas condições ambientais existentes durante o desenvolvimento do fruto, nomeadamente a temperatura (JOËT et al., 2010; BERTRAND et al., 2012; SANTOS et al., 2015; RAMALHO et al., 2018). No seu conjunto todos estes impactos têm o potencial de aumentar a vulnerabilidade da cultura nos níveis agrícola, social e econômico (BACA et al., 2014).

Estudos recentes mostraram que alguns génotipos de *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner conseguem tolerar temperaturas até 37 °C, bem acima do que era tradicionalmente considerado, fato atribuído à capacidade das plantas de efetuar diversos ajustes ao nível metabólico e molecular (MARTINS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016). O cafeeiro, pode inclusive beneficiar significativamente do aumento atmosférico de CO₂, ainda que com aumento de temperatura do ar, desde que haja adequada disponibilidade hídrica (DAMATTA et al., 2018; 2019). Contudo, a 42 °C terá já sido ultrapassado o limite de

tolerância das plantas (sujeitas a $380 \mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ no ar), pois são detectados impactos significativos a vários níveis (RODRIGUES et al., 2016; MARTINS et al., 2016). Deve, contudo referir-se que a resiliência das plantas até $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ocorreu em condições de fornecimento de água sem restrições, ficando o questionamento de como será quando submetidas em simultâneo a limitação de disponibilidade hídrica, algo que não foi estudado para esta cultura. Mas é provável que ocorra um agravamento no nível de danos, pois ambas as limitações por afetam directamente os componentes da maquinaria fotossintética (JIANG et al., 2016). No entanto, dependendo do nível de tolerância e de estresse, as plantas mostram respostas diferentes (MISHRA et al., 2016). Portanto, será importante estudar os efeitos da sobreposição das tensões abióticas nas plantas para entender suas respostas, pois, respostas rápidas do metabolismo de células vegetais e aclimação da maquinaria fotossintética são fatores-chave para a sobrevivência em um ambiente flutuante (NOURI et al., 2015). Complementarmente, atenção deve ser dada à capacidade de recuperação das plantas após período de estresse, sempre no contexto dos mecanismos fisiológicos específicos envolvidos na adaptação às mudanças naturais nas condições ambientais (SONG et al., 2014).

Diante disso surge uma crescente necessidade do estudo dos impactos das mudanças climáticas considerando combinação de seca e calor sob o metabolismo fotossintético em *Coffea* spp. Neste contexto, o objetivo deste estudo é avaliar o impacto e os mecanismos de resposta do cafeeiro à exposição a temperaturas supra-ótimas e restrição hídrica, de forma independente ou em conjunto, de forma a contribuir para a percepção de possíveis medidas a ser tomadas e, no seu todo, sustentabilidade futura da cafeicultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal e Condições Experimentais

Dois genótipos de café amplamente cultivados, das duas principais espécies produtoras, *C. arabica* L. cv. Icatu e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) foram avaliados. Plantas com cerca de sete anos de idade, cultivadas em câmaras de crescimento *walk-in* (EHHF 10000, ARALAB, Portugal), em vasos de 80 L com um substrato composto por uma mistura de solo, turfa e areia (3:1:3, v/v/v) e foram mantidas em condições ambientais controladas de temperatura ($25/20 \text{ }^\circ\text{C}$, dia/noite), irradiância (cerca de $700\text{-}800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), $[\text{CO}_2]$ no ar de $380 \mu\text{L L}^{-1}$, humidade relativa (75%), fotoperíodo (12 h) e disponibilidade hídrica sem restrições.

Ao iniciar o ensaio as plantas foram submetidas a duas condições hídricas: 1) Controle (Ctl) - bem regadas, com teor relativo de água foliar de alvorada (RWC_{pd}) de cerca

de 95% e potencial hídrico de alvorada (Ψ_{pd}) até cerca de 0,5 MPa, e 2) seca severa (SD) com $RWC_{pd} < 70\%$ e $\Psi_{pd} < -2,5$ MPa). Após cerca de 15 dias para atingir estes níveis e mais 5 dias de estabilização nessas condições, a temperatura foi gradualmente aumentada ($0,5$ °C dia^{-1} da temperatura diurna) desde $25/20$ °C até $42/30$ °C, com cinco dias de estabilização a $31/25$, $37/28$ e $42/30$ °C para possibilitar as avaliações programadas. Por fim, a temperatura foi reajustada para $25/20$ °C e normalizado o fornecimento de água por rega, acompanhando-se a capacidade de recuperação das plantas durante 14 dias (Rec14). O ensaio teve assim um total de 83 dias desde o início de estabelecimento dos níveis de disponibilidade hídricos até ao fim do período de recuperação considerado.

Todas as determinações foram efetuadas nas temperaturas chave de $25/20$, $31/25$, $37/28$, $42/30$ °C e a Rec14. Adicionalmente, alguns parâmetros (não destrutivos) foram também avaliados em temperaturas intermédias ($28/23$, $34/28$, $39/30$ °C), assim como ao fim de 4 (Rec4) e entre 7 e 10 (Rec7-10) dias após reestabelecimento da temperatura controle e dos níveis de disponibilidade hídrica.

As determinações foram efetuadas em folhas recém-maduras, localizadas na parte superior (iluminada) de cada planta. Exceto para os parâmetros de caracterização hídrica (RWC_{pd} e Ψ_{pd}) e as avaliações de fluorescência da clorofila (Chl) a em condições de adaptação às escuridão (F_0 e F_v/F_m), as análises e recolhas de material foram efetuadas após *ca.* 2 h de iluminação. O material foliar coletado destinou-se a avaliações imediatas (por exemplo quando envolveu o isolamento de cloroplastos), ou foi congelado instantaneamente em N_2 líquido e armazenado a -80 °C para análises posteriores (por exemplo, análises de actividades das enzimas da fotossíntese e respiração).

Ao longo do experimento as plantas foram mantidas sem restrições nutricionais, seguindo as recomendações para a cultura.

Relações Hídricas Foliaves em Pre-Alvorada - Determinação do Potencial Hídrico e Teor Relativo de Água

A avaliação do potencial hídrico foliar de alvorada (Ψ_{pd}) foi efetuada antes do “amanhecer” (i.e., antes das luzes das fitoclimas acenderem), normalmente entre as 5 e 7 h da manhã, utilizando uma câmara de pressão tipo Schölander (Modelo 1000, PMS Instrument Co., Albany, OR, EUA), com nitrogênio gasoso.

Para quantificação do Teor Relativo de Água (RWC_{pd}) cortaram-se 8 discos de $0,5$ cm^2 das mesmas folhas usadas para a determinação de Ψ_{pd} . O peso fresco (FW) foi imediatamente determinado em balança. Para obter o peso túrgido (TW) os discos foram

colocados numa câmara húmida e deixados a reidratar durante 24 h. O peso seco (DW) foi obtido após secagem dos discos em estufa a 80 °C durante 48 h (até atingir peso constante). O RWC_{pd} (%) foi calculado através da fórmula [$RWC_{pd}(\%) = ((FW - DW)/(TW - DW)) \times 100$] (MATOS et al., 2002).

Determinações Estomáticas

Impressões da superfície abaxial da folha foram tiradas e observadas ao microscópio óptico usando amostras de cinco plantas, duas folhas por planta, e em cada folha, três áreas diferentes foram analisadas (RAMALHO et al., 2013b; RODRIGUES et al., 2016). A densidade estomática (DE) foi calculada como o número de estômatos por unidade de área foliar, e o índice estomático (IE) foi calculado como $IE = [(\text{estômatos}) / (\text{células totais} + \text{estômatos})] \times 100$. Para a determinação da área estomática (AE), 60 estômatos selecionados aleatoriamente foram medidos nas mesmas folhas, usando um micrômetro ocular. A área de cada estômato individual foi calculada como $AE = \pi ab$, onde a e b são 1/2 comprimento e 1/2 largura, respectivamente, assumindo assim que a forma estomática é uma elipse.

Trocas Gasosas Foliaves

As taxas foliares de fotossíntese líquida (P_n), assim como as de condutância estomática (g_s) e transpiração (E) para o vapor de água, foram obtidas sob condições fotossintéticas em estado estacionário após *ca.* 2 h de iluminação (no meio da manhã). Foi utilizado um analisador portátil de gases infravermelhos de sistema aberto (Li-Cor 6400, LiCor, Lincoln, NE, EUA), com fornecimento externo de $[CO_2]$ de *ca.* 380 $\mu\text{L L}^{-1}$ e irradiância de *ca.* 700-800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A eficiência instantânea do uso da água foliar ($iWUE$) foi calculada como a razão P_n/E , representando as unidades de CO_2 assimilado por cada unidade de água perdida através da transpiração.

A capacidade fotossintética (A_{max}), representando a taxa de fotossíntese máxima obtida com nível de luz e $[CO_2]$ saturantes, e temperatura ótima, foi medida em discos de folhas (1,86 cm^2), através da evolução da libertação de O_2 , usando um eléctrodo de O_2 tipo Clark (LD2/2; Hansatech, Kings Lynn, Inglaterra). A_{max} foi obtido a 25 °C, *ca.* 7% de CO_2 (fornecido por 400 μl de 2 M $KHCO_3$) e aumentando as irradiâncias até 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ usando uma lâmpada Björkman (Hansatech) e filtros neutros.

Análise de Fluorescência da Clorofila a

Os parâmetros de fluorescência de Chl a foram determinados nas mesmas folhas

usadas para medições de trocas gasosas, usando um sistema PAM-2000 (H. Walz, EffeTrich, Alemanha), como descrito previamente (RODRIGUES et al., 2016) e seguindo as fórmulas discutidas anteriormente (KRAMER et al. 2004; KRAUSE e JAHNS, 2004; SCHREIBER, 2004). As medidas de fluorescência mínima das moléculas excitadas de Chl *a* das antenas, antes da energia de excitação migrar para os centros de reação (F_o), de fluorescência máxima, correspondente à redução completa de receptores do fotossistema primário *PSII* (F_m) e da eficiência fotoquímica máxima de *PSII* (F_v/F_m) foram realizadas em folhas adaptadas ao escuro durante a noite. F_o foi determinada usando uma luz fraca ($< 0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); F_m foi obtida usando um pulso de saturação de 0,8 s de *ca.* $7500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz actínica.

Um segundo conjunto de parâmetros foi avaliado em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese, com $700\text{-}800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz actínica e *flash* saturantes sobrepostos. Neste conjunto estão incluídos q_L , q_N , $Y_{(II)}$ ($=\phi_e$), $Y_{(NPQ)}$, $Y_{(NO)}$, F_v'/F_m' (KRAMER et al., 2004; KLUGHAMMER e SCHREIBER, 2008) e F_s/F_m' (STIRBET e GOVINDJEE, 2011). F_o' , necessário para a determinação de fatores de amortecimento (*quenchings*) da fluorescência foi obtido no escuro imediatamente após a luz actínica ter sido desligada e antes da primeira fase rápida da cinética de relaxamento da fluorescência. F_v'/F_m' representa a eficiência fotoquímica real do *PSII* da conversão de energia sob exposição à luz. q_L é o *quenching* fotoquímico e representa a proporção de energia capturada pelos centros abertos *PSII* e direcionada para eventos fotoquímicos, com base no conceito de antenas *PSII* interconectadas. q_N é o *quenching* não-fotoquímico e representa a dissipação sustentada e fotoprotectora de energia térmica. As estimativas dos rendimentos quânticos de transporte fotossintético não-cíclico de elétrons ($Y_{(II)}$), de dissipação de energia não regulada (calor e fluorescência) pelo *PSII* ($Y_{(NO)}$) e de dissipação de energia regulada pelo *PSII* ($Y_{(NPQ)}$), onde [$Y_{(II)}+Y_{(NPQ)}+Y_{(NO)}=1$], foram também obtidas (KRAMER et al., 2004; HUANG et al., 2011). Por fim, avaliou-se a estimativa da constante da taxa de inativação de *PSII*, F_s/F_m' (STIRBET e GOVINDJEE, 2011).

Taxas de Transporte Tilacóidal de Elétrons

As frações membranares subcloroplásticas foram obtidas de um pool de folhas (cerca de 5 g FW) de 5 a 6 plantas, como descrito previamente para cafeeiro (RAMALHO et al., 1999). As taxas de transporte de elétrons *in vivo* associadas à *PSI* ($\text{DCPIP} \rightarrow \text{MV}$) e *PSII*, incluindo ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$) ou excluindo ($\text{DPC} \rightarrow \text{DCPIP}$) o complexo de oxigênio (*OE*C), foram medidas com um eletrodo de O_2 (LW2, Hansatech), utilizando 1 mL da mistura reacional contendo *ca.* 100 mg Chl., a 25 °C e sob irradiância de *ca.* $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

fornecida por uma lâmpada Björkman (Hansatech).

Quantificação de Transportadores Tilacóidais de Elétrons

Para o isolamento de cloroplastos para determinações dos citocromos utilizaram-se *ca.* 10 g FW de tecido foliar, seguindo-se os procedimentos de Spiller e Terry (1980), com pequenas modificações (RAMALHO et al., 1999). As concentrações de citocromo b_{559HP} , b_{559LP} , b_{563} e f foram determinadas de acordo com Houchins e Hind (1984). Os valores foram obtidos a 545 nm utilizando comprimentos de onda *isobest* de 528 e 568 nm para o citocromo b_{559} e 552 e 572 nm para o citocromo b_{563} . Um coeficiente de extinção de $20 \text{ mmol/L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi assumido. Os valores para o citocromo f foram obtidos a 554 nm, assumindo um coeficiente de extinção de $19,7 \text{ mmol/L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para isolamento das frações membranares subcloroplásticas para determinação do PQ-9, utilizaram-se *ca.* 10 g FW de tecido foliar, seguindo-se os procedimentos de Droppa et al. (1987), com pequenas modificações (RAMALHO et al., 1999). O teor de PQ-9 foi determinado de acordo com Redfearn e Friend (1962), medindo a diferença de absorção entre as formas oxidada e reduzida de PQ-9 a 255 nm, em relação aos comprimentos de onda *isobest* 276 e 308 nm. Um coeficiente de extinção de $14,8 \text{ mmol/L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi assumido.

Atividade de Enzimas da Fotossíntese

As determinações das atividades enzimática da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO; EC 4.1.1.39) (OSÓRIO et al., 2006; TAZOE et al., 2008) e ribulose-5-fosfato cinase (Ru5PK; EC 2.7.1.19) (SOUZA et al., 2005), foram adaptadas a medição espectrofotométrica (RuBisCO) e otimização para o cafeeiro (ambas as enzimas) (RAMALHO et al., 2013b). As amostras foliares de folhas maduras recentemente expandidas foram colhidas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até serem analisadas. Foram então reduzidas a pó fino em nitrogênio líquido, retirando-se uma alíquota de cerca de 100 mg FW que foi macerada num almofariz arrefecido, usando 1 mL de tampão de extração, constituído por tampão 100 mM Tris-HCl, pH 8, contendo 10 mM MgCl_2 , 15 mM NaHCO_3 , 10 mM β -mercaptoetanol, 2 mM DTT, 1% (v/v) Triton X-100, 2% (v/v) “Complete-protease inhibitor cocktail” (para proteger as enzimas da ação de proteases) (Roche, ref. 04693159001), 4% (p/v) PVPP insolúvel e 10% (v/v) glicerol. Os extratos foram centrifugados (16000 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min) e o sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação espectrofotométrica das actividades enzimáticas, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, num espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Japão).

Atividade da RuBisCO - para a determinação da atividade da RuBisCO utilizou-se o tampão de medida 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 25 mM MgCl₂, 0.1 mM, EDTA, 15 mM ATP, 0.1 mM NAPH, 10 mM Fosfocreatina, 8 U/mL, 12 U/mL creatina fosfocinase (CPK), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), 10 U/mL ácido 3-fosfoglicérico fosfocinase (PGAK). Para a determinação da atividade inicial da RuBisCO adicionou-se 0.6 mM ribose-5-fosfato e posteriormente 10 µL de amostra, seguido de leitura imediata (modificado de RAMALHO et al., 2003; OSÓRIO et al., 2006). Para determinação atividade total da RuBisCO adicionou-se 10 µL de amostra, seguindo-se um período de incubação de 20 min, findo o qual se iniciou a reação com a adição de 0.6 mM ribose-5-fosfato num volume final de 1 mL. O ensaio espectrofotométrico segue a oxidação do NADH dependente do 3-PGA a 340 nm.

Atividade da Ru5PK - a determinação da atividade da Ru5PK foi efetuada de acordo com o método de Souza et al. (2005), como descrito em Ramalho et al. (2013). De forma sucinta, adicionou-se 20 µL do sobrenadante (referido acima nos procedimentos gerais de extração), na célula de espectrofotômetro com o meio de ensaio de tampão 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, contendo 8 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 20 mM fosfoenolpiruvato, 5 mM ATP, 1 mM NADH, 20 mM DTT, 8 U piruvato cinase, 10 U mL⁻¹ lactato desidrogenase e 5 U mL⁻¹ fosforiboisomerase. Após um período de incubação de 15 min, a reação foi iniciada com a adição de 10 µL de 500 mM ribose-5-fosfato, seguindo-se espectrofotometricamente a oxidação do NADH a 340 nm.

Permeabilidade Membranar

Para esta avaliação usaram-se 10 discos foliares (0,5 cm² cada), que foram imediatamente lavados 3 vezes com água desmineralizada, colocados em frascos com 10 mL com água desmineralizada e mantidos a *ca.* 20 °C (DIAS et al., 2010; RAMALHO et al., 2013). A perda de eletrólitos foi medida até à sua estabilização (*ca.* 22 h), usando um medidor de condutividade (Crison GLP31, Crison Instruments, S.A., Espanha). A condutividade total foi obtida após os frascos com os discos serem expostos a 90 °C por 2 h em estufa e posteriormente resfriados. A perda de eletrólitos pelas membranas às 22 h foi calculada como a porcentagem da condutividade total.

Análise Estatística

Os parâmetros medidos e calculados foram analisados por meio de uma ANOVA two-way (P<0,05) para quantificar as diferenças entre as duas condições hídricas, entre as

diversas temperaturas, e sua interação, seguido pelo teste de Tukey para comparações de médias. Cada ANOVA foi realizada independentemente para cada um dos genótipos estudados. Um nível de confiança de 95% foi adotado para todos os testes.

RESULTADOS

Potencial Hídrico e Conteúdo Relativo de Água

O valores de pré-alvorada (ou *predawn*) do potencial hídrico (Ψ_{pd}) e Conteúdo Relativo de Água (RWC_{pd}) foliar de CL153 e Icatu foram severamente diminuídos com a imposição do estresse hídrico e a sobreposição dos dois estresses provocou ainda maiores reduções nas plantas de ambas às espécies. O aumento de temperatura não teve impacto significativo nestes parâmetros hídricos (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação do potencial hídrico (Ψ_{pd}) e Conteúdo Relativo de Água (RWC_{pd}) foliar, em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (SD) e crescentes níveis de temperatura [controle (25/20 °C, dia/noite), e temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28 e 42/30 °C], e recuperação ao fim de 4 dias (Rec4), 7 a 10 dias (Rec7-10) e 14 dias (Rec14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=4-6). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letras minúsculas (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)						
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	Rec 4	Rec 7-10	Rec 14
		Potencial hídrico (Ψ_{pd}, MPa)						
CL 153	Ctl	-0,31 \pm 0,06aA	-0,54 \pm 0,03aA	-0,64 \pm 0,17aA	-0,77 \pm 0,34aA	-0,73 \pm 0,21aA	-0,50 \pm 0,00aA	-0,66 \pm 0,07aA
	SD	-3,85 \pm 0,44bB	-3,56 \pm 0,23bB	-4,47 \pm 0,31bB	-4,38 \pm 0,15bB	-1,01 \pm 0,16aA	-1,10 \pm 0,22aA	-0,93 \pm 0,11aA
Icatu	Ctl	-0,34 \pm 0,02aA	-0,51 \pm 0,07aA	-0,55 \pm 0,03aA	-0,70 \pm 0,18aA	-0,60 \pm 0,07aA	-0,60 \pm 0,04aA	-0,49 \pm 0,05aA
	SD	-3,69 \pm 0,19bB	-4,60 \pm 0,32bC	-4,46 \pm 0,33bC	-4,14 \pm 0,45bC	-0,79 \pm 0,22aA	-0,46 \pm 0,07aA	-0,54 \pm 0,09aA
		Conteúdo Relativo de Água (RWC_{pd}, %)						
CL 153	Ctl	91,1 \pm 1,2aA	93,7 \pm 0,8aA	92,0 \pm 1,5aA	94,6 \pm 0,6aA	94,1 \pm 1,1aA	93,8 \pm 1,4aA	90,8 \pm 1,3aA
	SD	57,5 \pm 4,4bB	61,5 \pm 4,6bB	59,1 \pm 3,1bB	55,2 \pm 7,9bB	90,5 \pm 5,2aA	90,0 \pm 3,8aA	88,4 \pm 1,6aA
Icatu	Ctl	96,2 \pm 1,1aA	92,5 \pm 0,5aA	94,4 \pm 0,9aA	95,3 \pm 0,5aA	94,3 \pm 1,2aA	96,8 \pm 0,7aA	92,4 \pm 0,7aA
	SD	60,7 \pm 2,5bB	53,1 \pm 3,1bC	51,7 \pm 4,8bC	47,3 \pm 1,5bC	90,0 \pm 4,2aA	93,2 \pm 1,4aA	89,9 \pm 1,8aA

Nas plants SD os valores de Ψ_{pd} atingiram mínimos de -4,47 MPa no CL153 a 37/28 °C, e de -4,60 MPa em Icatu a 31/25 °C, mas sem diferenças para os valores a 42/30 °C. De igual modo o RWC_{pd} foi severamente diminuído, atingindo valores entre 55,2 e 61,5% no CL153, e 47,3 e 60,7% em Icatu, com os valores mínimos de RWC_{pd} a serem observados na temperatura de 42/30 °C em ambos os genótipos.

As plantas bem regadas mantiveram potenciais similares independente do aumento de temperatura, variando de -0,31 a -0,77 MPa nas plantas de CL 153 e -0,34 a -0,70 em

Icatu, enquanto o RWC_{pd} se manteve acima de 90% independente da temperatura e para ambos os genótipos. No período de recuperação os valores de Ψ_{pd} e RWC_{pd} aumentaram de forma considerável logo ao fim de 4 dias (e até ao final do período analisado), não mostrando diferenças em relação às respectivas plantas controle.

Características Estomáticas

Apesar de alguma flutuação, o valor de densidade estomática (DE) em CL153 não foi significativamente alterado com a imposição do estresse hídrico, mas aumentou gradualmente com a imposição do calor, apresentando diferença significativa a 42/30 °C. Diferentemente, Icatu mostrou redução da DE com a imposição individual de seca severa e temperatura (só a 42/30 °C), atingindo valores ainda mais baixos com a sobreposição de estresses (plantas SD a 42/30 °C).

Tabela 2. Avaliação da densidade estomática, índice estomático e área estomática de folhas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (SD); e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28, 42/30 °C e recuperação ao fim 14 dias (Rec 14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=6). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letras minúsculas (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	Rec14
Densidade estomática (número estomas mm⁻²)						
CL 153	Ctl	249,95 \pm 10,02aB	271,95 \pm 12,93aAB	293,00 \pm 15,07aAB	320,98 \pm 12,34aA	310,73 \pm 18,47aAB
	SD	274,89 \pm 14,38aB	288,22 \pm 29,03aAB	253,49 \pm 11,67aAB	308,64 \pm 13,78aA	279,01 \pm 16,64aAB
Icatu	Ctl	229,63 \pm 21,96aA	226,33 \pm 10,41aAB	227,16 \pm 10,76aA	179,93 \pm 5,48 aB	167,12 \pm 7,71 bB
	SD	196,70 \pm 11,71bA	177,77 \pm 14,54bB	213,99 \pm 9,30bA	163,13 \pm 6,72bB	184,36 \pm 11,0aB
Índice estomático (%)						
CL 153	Ctl	18,62 \pm 0,65aA	15,69 \pm 0,26 aA	15,62 \pm 0,26 aA	17,64 \pm 0,41 aA	16,75 \pm 0,75 aA
	SD	16,68 \pm 0,30 aA	17,58 \pm 0,76 aA	15,81 \pm 0,80 aA	17,46 \pm 0,55 aA	17,79 \pm 1,08 aA
Icatu	Ctl	18,31 \pm 0,52 aA	18,10 \pm 0,36 aA	18,91 \pm 0,35 aA	16,94 \pm 0,56 aA	18,12 \pm 0,57 aA
	SD	19,14 \pm 0,71 aA	17,61 \pm 0,70 aA	18,42 \pm 0,68 aA	17,86 \pm 0,52 aA	19,31 \pm 0,65 aA
Área estomática (µm²)						
CL 153	Ctl	272,51 \pm 6,81aA	202,71 \pm 4,48bC	178,64 \pm 5,81bD	164,69 \pm 2,77bD	230,62 \pm 4,61aB
	SD	203,68 \pm 6,60bC	253,86 \pm 8,87aA	224,87 \pm 5,07aBC	206,91 \pm 3,09aC	232,80 \pm 3,82aAB
Icatu	Ctl	280,16 \pm 9,49bAB	211,46 \pm 6,83aD	240,02 \pm 3,94aC	259,53 \pm 4,84aBC	294,48 \pm 5,56aA
	SD	299,57 \pm 16,87aA	203,94 \pm 6,61aC	219,40 \pm 5,51bC	244,68 \pm 4,45aB	289,84 \pm 6,06aA

A área dos estômatos de CL153 diminuiu em condições de estresse hídrico (a 25/20 °C) e do aumento de temperatura (plantas Ctl), com o valor mínimo a 42/30 °C. Com ambos os estresses este parâmetro foi menos afectado que nas plantas Ctl, e, invertendo a relação existente a 25/20 °C. Em Icatu o tamanho dos estômatos aumentou apenas com a seca. Em

ambos os tratamentos hídricos ocorre uma redução da área dos estômatos com o aumento de temperatura. Contudo este decréscimo foi muito superior em *SD*, de tal forma que Ctl apresenta um maior valor a 37/28 °C, apesar de não haver diferenças entre Ctl e *SD* a 42/30 °C. Esta proximidade de valores manteve-se no período de recuperação, durante o qual os valores tenderam para míveis semelhantes aos do início do experimento (25/20 °C).

O índice estomático não mostrou alterações significativas para nenhuma condição imposta.

Trocas Gasosas Foliaves

A taxa fotossintética líquida (P_n) foi significativamente diminuída em ambos os genótipos pela exposição individual ao estresse hídrico. O mesmo ocorreu para as taxas de condutância estomática (g_s) e transpiração (E), para a $[CO_2]$ interna (C_i), a eficiência instantânea do uso da água ($iWUE$), e para a capacidade fotossintética (A_{max}) (Tabela 3).

Por seu lado, a exposição apenas ao aumento de temperatura (portanto em plantas regadas) provocou impactos diferentes nestes mesmos parâmetros, consoante o genótipo. Nas plantas de CL153, a P_n foi claramente afetada a 39/30 °C e 42/30 °C, enquanto Icatu apresentou decréscimos significativos a partir de 34/28 °C. Em ambos os casos, a g_s decresceu precisamente à temperatura em que P_n foi afetada. Apesar de C_i não ter diminuído nessas temperaturas, notou-se que o potencial fotossintético em ambos os genótipos foi afetado apenas acima de 37/28 °C.

A exposição simultânea a ambas as condições de estresse provocaram os maiores impactos. Nos dois genótipos a P_n apresentou valores nulos (ou mesmo negativos) desde a temperatura de 31/25 °C, apesar da g_s se manter a valores igualmente baixos de 25/20 °C até 42/30 °C. Esse fecho estomático não evitou, contudo o aumento da perda de água por transpiração das plantas *SD* com o aumento da temperatura, apesar de num valor muito inferior ao das plantas Ctl. É notável que A_{max} mantenha valores relativamente próximos dos observados nas plantas Ctl a 42/30 °C em ambos os genótipos. As plantas *SD* de CL153 mantiveram valores de A_{max} de 25/20 °C até 42/30 °C, sugerindo ausência de impacto agravado pela exposição em simultânea à falta de água e calor. Já em Icatu, observou-se um impacto acrescido de ambos os estresses em simultâneo, mas apenas a 42/30 °C.

Tabela 3. Avaliação das taxas de fotossíntese líquida (P_n), condutância estomática ao vapor de água (g_s), transpiração (E), e capacidade fotossintética (A_{max}), assim como os valores da concentração interna de CO_2 (C_i), eficiência intrínseca do uso da água ($iWUE$) em *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu submetidas a duas condições de água: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (SD); e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), temperaturas supra-ótimas de 28/23, 31/25, 34/28, 37/28, 39/30, e 42/30 °C, e recuperação ao fim de 4 dias (Rec4), 7-10 dias (Rec7-10) e 14 dias (Rec14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=6). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letras minúsculas (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)									
		25/20 °C	28/23 °C	31/25 °C	34/28 °C	37/28 °C	39/30 °C	42/30 °C	Rec4	Rec7-10	Rec14
P_n ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)											
CL 153	Ctl	5,68 \pm 0,48aA	3,85 \pm 0,46aAB	3,72 \pm 0,25aAB	3,29 \pm 0,51aBC	4,20 \pm 1,17aAB	1,23 \pm 0,18aC	1,24 \pm 0,30aC	2,91 \pm 0,35aBC	3,11 \pm 0,20aBC	4,33 \pm 0,10aAB
	SD	1,01 \pm 0,65bA	0,43 \pm 0,19bB	-0,09 \pm 0,16bB	0,00 \pm 0,25bB	-0,16 \pm 0,25bB	-0,25 \pm 0,07bB	-0,48 \pm 0,18bB	1,51 \pm 0,29bB	3,87 \pm 0,59aA	4,13 \pm 0,54aA
Icatu	Ctl	5,06 \pm 0,40aAB	4,43 \pm 0,41aABC	4,16 \pm 0,37aABCD	2,77 \pm 0,26aCD	2,76 \pm 0,36aCD	2,71 \pm 0,39aD	2,85 \pm 0,41aCD	4,17 \pm 0,15aBCD	5,31 \pm 0,44aAB	6,12 \pm 0,48aA
	SD	0,41 \pm 0,29bCD	0,14 \pm 0,26bD	-0,35 \pm 0,07bD	-0,01 \pm 0,26bD	0,15 \pm 0,16bD	-0,13 \pm 0,07bD	-0,13 \pm 0,15bD	1,87 \pm 0,35bC	3,61 \pm 0,65bB	5,39 \pm 0,46aA
g_s ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)											
CL 153	Ctl	43,3 \pm 6,9aB	52,8 \pm 2,6aA	32,7 \pm 4,2aAB	32,8 \pm 3,2aAB	52,6 \pm 11,2aA	27,7 \pm 8,5aB	21,3 \pm 4,2aB	27,7 \pm 3,6aB	36,6 \pm 3,6aAB	37,2 \pm 3,5aAB
	SD	10,7 \pm 6,8bC	9,7 \pm 2,2bC	10,6 \pm 1,7bC	7,4 \pm 1,1bC	9,0 \pm 1,5bC	5,6 \pm 0,6bC	7,0 \pm 1,0bC	17,0 \pm 3,5aBC	50,9 \pm 8,3aA	40,0 \pm 8,7aAB
Icatu	Ctl	48,7 \pm 5,1aBC	43,5 \pm 8,8aC	42,7 \pm 8,8aC	29,3 \pm 2,9aC	28,6 \pm 4,6aC	51,3 \pm 8,6aBC	77,4 \pm 12,8aAB	57,8 \pm 3,6aABC	78,5 \pm 12,3aAB	77,7 \pm 13,2aAB
	SD	11,4 \pm 2,7bC	6,6 \pm 1,0bC	6,2 \pm 0,8bC	6,6 \pm 1,4bC	4,8 \pm 1,2bC	6,3 \pm 0,4bC	5,0 \pm 0,5bC	19,4 \pm 1,8bBC	49,0 \pm 6,7bAB	66,8 \pm 9,5aA
C_i ($\mu\text{L L}^{-1}$)											
CL 153	Ctl	160,2 \pm 29,1bA	248,3 \pm 20,9bA	166,5 \pm 18,3bA	250,2 \pm 15,0bA	235,0 \pm 19,0bA	257,5 \pm 17,0bA	267,2 \pm 16,3bA	186,0 \pm 5,8aA	218,7 \pm 7,5aA	155,0 \pm 15,4aA
	SD	312,0 \pm 62,9aABCD	352,2 \pm 37,9aABC	397,4 \pm 23,7aA	341,6 \pm 51,5aABC	376,7 \pm 42,5aAB	410,4 \pm 13,9aA	422,8 \pm 30,5aA	218,2 \pm 36,3aCD	251,7 \pm 11,0 aBCD	184,3 \pm 27,2aD
Icatu	Ctl	166,7 \pm 44,1bA	203,0 \pm 67,4bA	197,9 \pm 29,8bA	220,1 \pm 20,3bA	194,7 \pm 27,0bA	258,3 \pm 5,3bA	267,8 \pm 15,3bA	237,2 \pm 3,2aA	233,7 \pm 12,3aA	204,8 \pm 14,7aA
	SD	317,5 \pm 20,6aBCDE	348,4 \pm 53,0aABCD	452,4 \pm 15,8aA	345,2 \pm 47,5aA	274,8 \pm 32,2aABCD	378,6 \pm 17,7aABC	414,7 \pm 21,5aAB	213,5 \pm 20,8aE	205,3 \pm 17,8aE	253,0 \pm 41,6aDE
E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)											
CL 153	Ctl	0,409 \pm 0,066aD	0,835 \pm 0,104aBC	0,951 \pm 0,053aBCD	1,926 \pm 0,462aA	1,818 \pm 0,371aAB	1,328 \pm 0,287aABC	1,201 \pm 0,210aABCD	0,520 \pm 0,055aCD	0,567 \pm 0,049aCD	0,616 \pm 0,064aCD
	SD	0,136 \pm 0,086aA	0,209 \pm 0,037bA	0,406 \pm 0,065bA	0,310 \pm 0,047bA	0,480 \pm 0,034bA	0,329 \pm 0,033bA	0,479 \pm 0,071bA	0,354 \pm 0,070aA	0,640 \pm 0,076aA	0,549 \pm 0,093aA
Icatu	Ctl	0,362 \pm 0,064aD	0,923 \pm 0,190 aCD	0,916 \pm 0,081aCD	1,134 \pm 0,069aC	1,278 \pm 0,217aC	2,080 \pm 0,237aB	2,938 \pm 0,435aA	1,015 \pm 0,071aCD	1,003 \pm 0,050aCD	0,969 \pm 0,080aCD
	SD	0,145 \pm 0,023aB	0,089 \pm 0,050bB	0,208 \pm 0,034bAB	0,280 \pm 0,056bAB	0,245 \pm 0,056bAB	0,362 \pm 0,022bAB	0,327 \pm 0,040bAB	0,401 \pm 0,030bAB	0,540 \pm 0,084bAB	0,833 \pm 0,116aA
$iWUE$ ($\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)											
CL 153	Ctl	12,10 \pm 2,66aA	3,71 \pm 0,29aCD	3,98 \pm 0,22aBCD	2,18 \pm 0,36aCD	2,63 \pm 0,57aCD	1,03 \pm 0,16aD	0,87 \pm 0,19aD	5,54 \pm 0,11aBC	5,60 \pm 0,28aBC	8,04 \pm 1,01aAB
	SD	4,58 \pm 1,74bBC	2,79 \pm 1,17aBCD	0,74 \pm 0,33bCD	2,80 \pm 1,18aBCD	2,23 \pm 1,62aBCD	-0,72 \pm 0,15aD	0,61 \pm 0,05aCD	4,74 \pm 1,00aBC	5,85 \pm 0,61aAB	9,10 \pm 1,80aA
Icatu	Ctl	15,31 \pm 3,19aA	4,53 \pm 0,91aB	4,38 \pm 0,78aB	2,16 \pm 0,23aB	3,05 \pm 0,87aB	1,29 \pm 0,10aB	1,18 \pm 0,19aB	4,18 \pm 0,14aB	5,27 \pm 0,30aB	6,38 \pm 0,22aB
	SD	3,03 \pm 0,95bAB	2,39 \pm 1,16aAB	3,42 \pm 2,29aAB	3,85 \pm 2,06aAB	1,18 \pm 0,46aB	0,18 \pm 0,09aB	0,13 \pm 0,02aB	4,50 \pm 0,62aAB	6,85 \pm 0,83aA	7,25 \pm 0,82aA
A_{max} ($\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)											
CL 153	Ctl	12,1 \pm 1,4aAB	-	13,8 \pm 1,9aAB	-	13,5 \pm 2,3aAB	-	8,3 \pm 0,3aB	9,4 \pm 1,8aAB	15,2 \pm 2,2aA	12,8 \pm 1,1aAB
	SD	7,1 \pm 0,7bAB	-	9,7 \pm 2,4bAB	-	8,5 \pm 1,1bAB	-	7,6 \pm 2,5aAB	8,3 \pm 0,9bAB	10,8 \pm 0,8bA	10,3 \pm 1,7bAB
Icatu	Ctl	11,1 \pm 0,9aBC	-	15,3 \pm 2,0aAB	-	10,8 \pm 1,7aC	-	5,4 \pm 1,0aD	13,5 \pm 1,3aABC	16,4 \pm 1,2aA	14,9 \pm 1,0aABC
	SD	8,8 \pm 1,2bBC	-	12,0 \pm 2,5bAB	-	7,8 \pm 1,4bC	-	4,1 \pm 0,4aD	10,8 \pm 2,0bABC	13,0 \pm 0,6bA	10,8 \pm 1,8bABC

A eficiência instantânea do uso da água ($iWUE$) foi fortemente afetada pela seca em ambos os genótipos (plantas SD a 25/20 °C). Adicionalmente, o aumento de temperatura ocasionou os maiores decréscimos de $iWUE$, com valores muito baixos a 39/30 °C e 42/30 °C. De notar que para as temperaturas de 34/28 °C e superiores não houve diferença entre plantas Ctl e SD em ambos os genótipos. Após reestabelecimento das condições hídricas e de temperatura as plantas Ctl e SD de ambos os genótipos apresentaram recuperação do $iWUE$, sem contudo atingirem os valores iniciais.

Contudo, deve notar-se que alguns dos impactos permaneceram ao longo do tempo no período de recuperação, de forma parcialmente distinta entre genótipos e devido á imposição simultânea de estresses. Para a P_n , enquanto as plantas de Icatu-Ctl apresentam total recuperação em Rec7-10, tal só sucede para Icatu- SD em Rec14, apesar dos valores de g_s e A_{max} terem recuperado em ambos os grupos de plantas já a Rec7-10. A_{max} apresenta recuperação total a Rec4 para Icatu-Ctl e Rec7-10 para Icatu- SD , mostrando valores significativamente maiores nas plantas Ctl no final do experimento. Deve igualmente notar-se que no final do experimento os valores de g_s foram tendencialmente superiores aos iniciais. Já as plantas de CL153 mostraram uma recuperação mais lenta e incompleta. Para a P_n , as plantas Ctl e SD apenas se aproximam dos valores iniciais em Rec14, ainda que A_{max} mostre total recuperação em Rec7-10 nas Ctl, mas não mostre total recuperação nas SD em Rec14.

Análise de Parâmetros da Fluorescência da Clorofila a

O obtenção de valores da fluorescência da clorofila a , o cálculo de diversos parâmetros (Tabela 4), assim como a sua análise, permitem uma identificação e caracterização mais detalhada dos pontos de impacto no funcionamento da maquinaria fotossintética. Em ambos os genótipos a fluorescência inicial (F_o) não mostrou impacto da seca, e aumentou significativamente devido à temperatura apenas a 42/30 °C, principalmente nas plantas Ctl. Apesar da interação de estresses diminuir o impacto (SD), as plantas Ctl recuperaram totalmente já em Rec4, mas as SD apenas em Rec7-10.

Sob seca (a 25/20 °C), a eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m) foi afetada apenas em CL153, enquanto o efeito significativo da temperatura ocorreu apenas a 42/30 °C em ambos os genótipos. Nesta temperatura, a interação de estresses não aconteceu em CL153, e aliviou o impacto em Icatu (plantas SD). Contudo, apesar das plantas Ctl apresentarem recuperação completa apenas em Rec14, o mesmo não se passa nas plantas SD que por essa altura continuaram a mostrar um valor um pouco abaixo do Ctl inicial em ambos os genótipos. Tal evidencia uma interação com impacto negativo que permanece para lá da presença das

condições de estresse no funcionamento do fotossistema II (*PSII*), ligado ao agravamento da severidade do estresse conjunto relativamente aos estresses individuais, ainda que as plantas *SD* de Icatu tenham sido menos afectadas a 42/30 °C.

Apesar de haver algumas diferenças, particularmente na extensão dos impactos, padrão semelhante foi igualmente observado noutros parâmetros. A estimativa do rendimento quântico do transporte não cíclico de elétrons ($Y_{(II)}$) mostrou impacto significativo da seca e da temperatura (apenas a 42/30 °C). Nesta temperatura as plantas *SD* de ambos os genótipos mostraram valores semelhantes entre si e sem diferença significativa para o valor inicial a 25/20 °C. Contudo, dado que os valores são bastante baixos, não é possível assegurar que não tenha havido interação (positiva ou negativa) dos dois estresses. De fato, a recuperação de $Y_{(II)}$ foi lenta e incompleta no final do experimento, sem diferenças entre plantas Ctl e *SD* em cada genótipo, apesar de em Rec4 as plantas *SD* parecerem recuperar mais rapidamente. Desta forma, parece não haver interação negativa dos dois estresses no $Y_{(II)}$.

Também o coeficiente de extinção fotoquímico (q_L) e a eficiência fotoquímica da conversão de energia do *PSII* em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese (F_v'/F_m') seguiram um padrão semelhante ao dos parâmetros anteriores, todos eles relacionados com a capacidade de uso da energia capturada pelas antenas e processada ao nível do *PSII*. Assim, ambos os genótipos mostraram um impacto significativo da seca a 25/20 °C. Apesar disso, em diversas temperaturas (até 31/25 °C em Icatu, e 39/30 °C em CL153) q_L não mostrou diferenças entre as plantas Ctl e *SD*. Adicionalmente, as plantas Ctl mantiveram os valores de q_L mesmo a 42/30 °C, enquanto o F_v'/F_m' só a essa temperatura foi significativamente afetado, mais em Icatu que em CL153. Contudo as plantas de Icatu (Ctl e *SD*) recuperaram totalmente F_v'/F_m' logo em Rec4, e CL153 em Rec7-10, ao passo que q_L não mostra diferença significativa entre Rec4 e a temperatura inicial apenas para Icatu (apesar dos valores médios de ambos os genótipos serem algo inferiores, mesmo em Rec14).

No que diz respeito aos parâmetros que refletem processos de dissipação de energia, verificou-se que o rendimento quântico da dissipação de energia regulada de *PSII* ($Y_{(NPQ)}$), e os coeficientes de extinção não-fotoquímica (NPQ e q_N), relativos aos mecanismos de defesa da planta através da dissipação da energia em excesso, mostraram padrões de variação semelhante entre si e inversa a outros parâmetros descritos acima. Uma vez mais, observou-se um impacto significativo da seca e da temperatura (apenas a 42/30 °C em ambos os genótipos) quando aplicados individualmente. Sublinhe-se a ausência de variação significativa mesmo a 39/30 °C. Não houve interação de estresses mesmo na temperatura máxima, onde as plantas *SD* apresentam valores semelhantes aos observados a 25/20 °C.

Tabela 4. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (SD); e a crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), temperaturas supra-ótimas de 28/23, 31/25, 34/28, 37/28, 39/30, 42/30 °C e recuperação ao fim de 4 dias (Rec4), 7 a 10 dias (Rec 7-10) e 14 dias (Rec 14). Os parâmetros incluem a fluorescência inicial (F_o); máxima eficiência fotoquímica do PSII (F_v/F_m); estimativa do rendimento quântico do transporte não cíclico de elétrons ($Y_{(II)}$); o rendimento quântico da dissipação de energia regulada de PSII, ($Y_{(NPQ)}$); o rendimento quântico da dissipação de energia não regulada (calor e fluorescência) de PSII, ($Y_{(NO)}$); dissipação térmica sustentada fotoprotetora (q_N); tempera fotoquímica baseada no conceito de antenas PSII interconectadas (q_L); a eficiência fotoquímica do PSII real da conversão de energia (F_v'/F_m'); e o preditor da constante de taxa de inativação de PSII (F_s/F_m'). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=6). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letras minúsculas (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)									
		25/20 °C	28/23 °C	31/25 °C	34/28 °C	37/28 °C	39/30 °C	42/30 °C	Rec4	Rec7-10	Rec14
F_o											
CL 153	Ctl	0,210 \pm 0,004aB	0,216 \pm 0,005aB	0,223 \pm 0,007aB	0,195 \pm 0,007aB	0,288 \pm 0,021aB	0,211 \pm 0,006aB	0,499 \pm 0,038aA	0,265 \pm 0,010bB	0,203 \pm 0,011aB	0,248 \pm 0,005aB
	SD	0,233 \pm 0,008aABC	0,275 \pm 0,016aABC	0,204 \pm 0,013aBC	0,182 \pm 0,013aC	0,214 \pm 0,018aBC	0,232 \pm 0,017aABC	0,349 \pm 0,020bA	0,353 \pm 0,020aA	0,214 \pm 0,008aABC	0,312 \pm 0,007aAB
Icatu	Ctl	0,251 \pm 0,007aB	0,282 \pm 0,007aB	0,265 \pm 0,006aB	0,224 \pm 0,009aB	0,336 \pm 0,016aB	0,214 \pm 0,004aB	0,650 \pm 0,062aA	0,270 \pm 0,007aB	0,206 \pm 0,017aB	0,237 \pm 0,011aB
	SD	0,244 \pm 0,005aAB	0,241 \pm 0,006aAB	0,220 \pm 0,009aAB	0,217 \pm 0,012aAB	0,226 \pm 0,012bAB	0,246 \pm 0,010aAB	0,343 \pm 0,015bA	0,329 \pm 0,009aAB	0,201 \pm 0,003aB	0,295 \pm 0,007aAB
F_v/F_m											
CL 153	Ctl	0,770 \pm 0,008aAB	0,784 \pm 0,005aAB	0,794 \pm 0,003aAB	0,793 \pm 0,006aA	0,789 \pm 0,007aA	0,765 \pm 0,008aAB	0,635 \pm 0,025aC	0,728 \pm 0,017aB	0,725 \pm 0,013aB	0,759 \pm 0,009aAB
	SD	0,705 \pm 0,025bAB	0,713 \pm 0,026bAB	0,724 \pm 0,024bAB	0,769 \pm 0,008bA	0,759 \pm 0,012bA	0,744 \pm 0,015bAB	0,631 \pm 0,021bC	0,673 \pm 0,014bB	0,688 \pm 0,015bB	0,718 \pm 0,007bAB
Icatu	Ctl	0,753 \pm 0,005aA	0,746 \pm 0,006aA	0,766 \pm 0,005aA	0,772 \pm 0,009aA	0,744 \pm 0,009aA	0,782 \pm 0,005aA	0,458 \pm 0,063bB	0,723 \pm 0,011aA	0,736 \pm 0,009aA	0,734 \pm 0,010aA
	SD	0,761 \pm 0,008aA	0,778 \pm 0,009aA	0,785 \pm 0,008aA	0,766 \pm 0,008aA	0,743 \pm 0,004aAB	0,737 \pm 0,014aAB	0,671 \pm 0,011aB	0,704 \pm 0,010aAB	0,718 \pm 0,006aAB	0,719 \pm 0,007aAB
$Y_{(II)}$											
CL 153	Ctl	0,358 \pm 0,044aABC	0,327 \pm 0,033aABC	0,391 \pm 0,027aAB	0,325 \pm 0,036aABC	0,401 \pm 0,013aA	0,279 \pm 0,038aABCD	0,219 \pm 0,019aCD	0,138 \pm 0,009aD	0,229 \pm 0,051aBCD	0,253 \pm 0,028aABCD
	SD	0,065 \pm 0,010bA	0,194 \pm 0,031bA	0,160 \pm 0,030bA	0,140 \pm 0,021bA	0,157 \pm 0,021bA	0,177 \pm 0,036bA	0,069 \pm 0,008bA	0,190 \pm 0,018aA	0,177 \pm 0,022aA	0,198 \pm 0,012aA
Icatu	Ctl	0,356 \pm 0,029aA	0,305 \pm 0,012aABC	0,361 \pm 0,014aA	0,301 \pm 0,038aABC	0,309 \pm 0,019aABC	0,318 \pm 0,029aAB	0,085 \pm 0,020aD	0,187 \pm 0,013aCD	0,203 \pm 0,013aBCD	0,265 \pm 0,022aABC
	SD	0,136 \pm 0,013bABCD	0,227 \pm 0,029aABC	0,206 \pm 0,035bABC	0,120 \pm 0,018bBCD	0,130 \pm 0,019bABCD	0,096 \pm 0,019bCD	0,065 \pm 0,011aD	0,230 \pm 0,027aAB	0,232 \pm 0,019aAB	0,252 \pm 0,020aA
$Y_{(NPQ)}$											
CL 153	Ctl	0,245 \pm 0,043bA	0,346 \pm 0,033bA	0,245 \pm 0,037bA	0,345 \pm 0,024bA	0,243 \pm 0,022bA	0,309 \pm 0,056bA	0,476 \pm 0,028bA	0,475 \pm 0,032aA	0,238 \pm 0,060aA	0,331 \pm 0,036aA
	SD	0,615 \pm 0,021aAB	0,499 \pm 0,033aAB	0,468 \pm 0,050aABC	0,511 \pm 0,027aAB	0,412 \pm 0,047aABC	0,469 \pm 0,072aABC	0,633 \pm 0,022aA	0,376 \pm 0,043aBC	0,225 \pm 0,038aC	0,426 \pm 0,028aABC
Icatu	Ctl	0,295 \pm 0,034bAB	0,317 \pm 0,021bAB	0,241 \pm 0,015bAB	0,321 \pm 0,034bAB	0,277 \pm 0,017bAB	0,316 \pm 0,035bAB	0,356 \pm 0,039bAB	0,440 \pm 0,021aA	0,163 \pm 0,049aB	0,191 \pm 0,024bB
	SD	0,585 \pm 0,026aAB	0,499 \pm 0,034aABC	0,472 \pm 0,061aABC	0,558 \pm 0,047aABC	0,460 \pm 0,045aABC	0,619 \pm 0,039aAB	0,649 \pm 0,021aA	0,410 \pm 0,052aCB	0,114 \pm 0,029aD	0,343 \pm 0,028aC
$Y_{(NO)}$											
CL 153	Ctl	0,397 \pm 0,015aB	0,327 \pm 0,018aB	0,364 \pm 0,029aB	0,329 \pm 0,016aB	0,356 \pm 0,024aB	0,412 \pm 0,032aB	0,305 \pm 0,017aB	0,388 \pm 0,034aB	0,533 \pm 0,050aA	0,416 \pm 0,025aB
	SD	0,320 \pm 0,026aB	0,306 \pm 0,014aB	0,372 \pm 0,030aB	0,349 \pm 0,015aB	0,432 \pm 0,035aB	0,354 \pm 0,047aB	0,298 \pm 0,019aB	0,434 \pm 0,027aB	0,597 \pm 0,034aA	0,376 \pm 0,022aB
Icatu	Ctl	0,349 \pm 0,018aC	0,378 \pm 0,024aC	0,398 \pm 0,014aBC	0,378 \pm 0,026aC	0,414 \pm 0,011aBC	0,366 \pm 0,013aC	0,559 \pm 0,049aAB	0,374 \pm 0,017aC	0,634 \pm 0,043aA	0,544 \pm 0,026aAB

	SD	0,280 ± 0,024aB	0,274 ± 0,014bB	0,322 ± 0,029aB	0,322 ± 0,035aB	0,410 ± 0,046aB	0,285 ± 0,028aB	0,287 ± 0,021bB	0,360 ± 0,028aB	0,654 ± 0,027aA	0,405 ± 0,021bB
<i>q_N</i>											
CL 153	Cfl	0,494 ± 0,038bAB	0,608 ± 0,041bAB	0,511 ± 0,054bABC	0,635 ± 0,03bAB	0,503 ± 0,037bBC	0,520 ± 0,055bABC	0,735 ± 0,030bA	0,681 ± 0,044bAB	0,454 ± 0,071bC	0,546 ± 0,043bBC
	SD	0,830 ± 0,021aAB	0,741 ± 0,025aAB	0,706 ± 0,048aABC	0,748 ± 0,02aAB	0,674 ± 0,048aBC	0,700 ± 0,077aABC	0,823 ± 0,021aA	0,639 ± 0,027aAB	0,452 ± 0,047aC	0,636 ± 0,037aBC
Icatu	Cfl	0,549 ± 0,041bABC	0,570 ± 0,037bABC	0,449 ± 0,030bABC	0,581 ± 0,05bAB	0,503 ± 0,023bABC	0,590 ± 0,029bAB	0,663 ± 0,057bA	0,646 ± 0,025aA	0,379 ± 0,052aBC	0,339 ± 0,033bC
	SD	0,807 ± 0,023aAB	0,779 ± 0,025aAB	0,722 ± 0,062aAB	0,773 ± 0,05aAB	0,707 ± 0,047aAB	0,830 ± 0,028aA	0,837 ± 0,023aA	0,647 ± 0,039aAB	0,332 ± 0,041aC	0,581 ± 0,038aB
<i>q_L</i>											
CL 153	Cfl	0,448 ± 0,066aA	0,302 ± 0,039aABC	0,396 ± 0,030aABC	0,343 ± 0,029aABC	0,359 ± 0,023aABC	0,267 ± 0,055aABC	0,416 ± 0,052aAB	0,191 ± 0,044aC	0,235 ± 0,047aBC	0,237 ± 0,034aBC
	SD	0,156 ± 0,030bA	0,241 ± 0,026aA	0,241 ± 0,042bA	0,208 ± 0,035bA	0,239 ± 0,032aA	0,309 ± 0,066aA	0,152 ± 0,020bA	0,314 ± 0,035aA	0,195 ± 0,021aA	0,234 ± 0,025aA
Icatu	Cfl	0,380 ± 0,029aA	0,332 ± 0,043aA	0,288 ± 0,027aA	0,316 ± 0,044aA	0,301 ± 0,033aA	0,371 ± 0,046aA	0,349 ± 0,107aA	0,184 ± 0,009aA	0,195 ± 0,013aA	0,223 ± 0,030aA
	SD	0,205 ± 0,028bA	0,341 ± 0,042aA	0,286 ± 0,022aA	0,186 ± 0,024bA	0,193 ± 0,025aA	0,191 ± 0,045bA	0,151 ± 0,034bA	0,283 ± 0,033aA	0,240 ± 0,021aA	0,282 ± 0,022aA
<i>F_v'/F_m'</i>											
CL 153	Cfl	0,595 ± 0,023aAB	0,623 ± 0,036aA	0,620 ± 0,024aA	0,581 ± 0,025aA	0,657 ± 0,015aA	0,614 ± 0,030aA	0,413 ± 0,028aB	0,495 ± 0,043aAB	0,561 ± 0,038aA	0,597 ± 0,024aAB
	SD	0,355 ± 0,037bAB	0,474 ± 0,035bA	0,454 ± 0,039bA	0,458 ± 0,018bA	0,447 ± 0,035bA	0,444 ± 0,056bA	0,343 ± 0,026bB	0,441 ± 0,011bAB	0,515 ± 0,030bA	0,528 ± 0,025bAB
Icatu	Cfl	0,593 ± 0,022aA	0,585 ± 0,028aA	0,671 ± 0,018aA	0,580 ± 0,031aA	0,608 ± 0,014aA	0,569 ± 0,015aA	0,283 ± 0,051aB	0,553 ± 0,014aA	0,567 ± 0,019aA	0,630 ± 0,018aA
	SD	0,449 ± 0,020bABC	0,464 ± 0,025bABC	0,455 ± 0,039bABC	0,423 ± 0,035bABC	0,437 ± 0,024bABC	0,393 ± 0,028bBC	0,340 ± 0,023aC	0,508 ± 0,026aAB	0,559 ± 0,019aA	0,544 ± 0,019aA
<i>F_s'/F_m'</i>											
CL 153	Cfl	0,642 ± 0,044bBCD	0,673 ± 0,033bBCD	0,609 ± 0,027bCD	0,675 ± 0,036bBCD	0,599 ± 0,013bD	0,721 ± 0,038bABCD	0,781 ± 0,019bAB	0,862 ± 0,009aA	0,771 ± 0,051aBCD	0,747 ± 0,028aABCD
	SD	0,935 ± 0,010aA	0,806 ± 0,031aA	0,840 ± 0,030aA	0,860 ± 0,021aA	0,843 ± 0,021aA	0,823 ± 0,036aA	0,931 ± 0,008aA	0,810 ± 0,018aA	0,823 ± 0,022aA	0,802 ± 0,012aA
Icatu	Cfl	0,644 ± 0,029bC	0,695 ± 0,012aBC	0,639 ± 0,014bC	0,699 ± 0,038bBC	0,691 ± 0,019bBC	0,682 ± 0,029bBC	0,915 ± 0,020aA	0,813 ± 0,013aAB	0,797 ± 0,013aAB	0,735 ± 0,022aBC
	SD	0,864 ± 0,013aABC	0,773 ± 0,029aBC	0,794 ± 0,035aBC	0,880 ± 0,018aABC	0,870 ± 0,019aABC	0,904 ± 0,019aAB	0,935 ± 0,011aA	0,770 ± 0,027aC	0,768 ± 0,019aC	0,748 ± 0,020aC

Ambos os genótipos apresentam total recuperação de $Y_{(NPQ)}$, NPQ e q_N em Rec7-10, sem distinção significativa entre plantas Ctl e *SD*, apesar destas últimas manterem valores tendencialmente maiores no final do experimento, sugerindo a necessidade de manter processos de dissipação de energia.

Por fim estudou-se os impactos no rendimento quântico não-fotoquímico relativo à fotoinibição e à dissipação de energia não regulada (calor e fluorescência) pelo *PSII*, $Y_{(NO)}$, que reflete a presença de limitações no uso da energia, e a estimativa da constante da taxa de inativação de *PSII* (F_v/F_m'). Impacto negativo significativo ao nível do *PSII* devido à seca foi apenas observado no F_v/F_m' . Até 39/30 °C as plantas Ctl de ambos os genótipos não revelam impactos em $Y_{(NO)}$ e F_v/F_m' , refletindo uma alta resiliência ao calor. Mesmo a 42/30 °C apenas as plantas Ctl de Icatu mostram uma subida no valor destes parâmetros face à temperatura de 25/20 °C. Adicionalmente, a conjugação de ambas as condições de estresse extremas (*SD* e 42/30 °C) não aumentou o impacto observado nestes parâmetros a 25/20 °C apenas com imposição da seca, revelando ausência de interação negativa e, por isso, a limitação de danos causados ao nível do *PSII*. Apesar de algumas flutuações ao longo do período de recuperação ambas os parâmetros mostram recuperação (quase) total em Rec14 em ambos os genótipos (incluindo as plantas *SD*), por comparação com os respectivos valores das plantas Ctl a 25/20 °C no início do experimento.

Taxas de Transporte Tilacóidal de Elétrons

Para complementar a informação do impacto dos estresses estudados sobre o *PSII* e também sobre o *PSI* as taxas de transporte tilacóidal de elétrons foram avaliadas. O funcionamento dos fotossistemas dos genótipos de cafés foi alterado com a imposição das condições de estresse, com algumas diferenças entre genótipos (Tabela 5).

Tabela 5. Alterações das taxas de transporte tilacóidal de elétrons associados com *PSII* (com e sem *OEC*) e *PSI*, em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu) submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (*SD*); e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28, 42/30 °C, e recuperação ao fim de 14 dias (Rec14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=X). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letras minúsculas (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				Rec14
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	
<i>PSII + OEC</i> ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW s}^{-1}$)						

CL 153	Ctl	0,228 ± 0,004aB	0,232 ± 0,004aB	0,244 ± 0,001aA	0,215 ± 0,001aC	0,130 ± 0,006bD
	SD	0,181 ± 0,004bB	0,229 ± 0,003aA	0,170 ± 0,004bBC	0,157 ± 0,004bD	0,163 ± 0,004aCD
Icatu	Ctl	0,221 ± 0,005bD	0,282 ± 0,002aA	0,260 ± 0,004aB	0,238 ± 0,001aC	0,228 ± 0,005aCD
	SD	0,243 ± 0,006aA	0,203 ± 0,004bC	0,225 ± 0,005bB	0,193 ± 0,005bC	0,163 ± 0,004bD
<i>PSII - OEC (μmol O₂ g⁻¹ DW s⁻¹)</i>						
CL 153	Ctl	0,262 ± 0,003aA	0,250 ± 0,003aAB	0,252 ± 0,002aAB	0,242 ± 0,001aB	0,144 ± 0,009bC
	SD	0,200 ± 0,004bB	0,250 ± 0,005aA	0,176 ± 0,003bC	0,162 ± 0,004bD	0,170 ± 0,002aCD
Icatu	Ctl	0,234 ± 0,003bB	0,323 ± 0,002aA	0,308 ± 0,003aA	0,219 ± 0,003aB	0,193 ± 0,017aC
	SD	0,257 ± 0,003aA	0,216 ± 0,004bB	0,213 ± 0,008bB	0,206 ± 0,005aB	0,160 ± 0,006bC
<i>PSI (μmol O₂ g⁻¹ DW s⁻¹)</i>						
CL 153	Ctl	0,661 ± 0,007aC	0,716 ± 0,005aA	0,704 ± 0,009aAB	0,678 ± 0,005aBC	0,379 ± 0,012bD
	SD	0,539 ± 0,009bB	0,601 ± 0,013bA	0,466 ± 0,011bC	0,454 ± 0,022bC	0,483 ± 0,012aC
Icatu	Ctl	0,710 ± 0,029aB	0,888 ± 0,009aA	0,907 ± 0,011aA	0,679 ± 0,044aB	0,728 ± 0,033aB
	SD	0,691 ± 0,008aA	0,612 ± 0,013bBC	0,674 ± 0,010bAB	0,568 ± 0,002bC	0,459 ± 0,014bD

Na temperatura controle, as plantas de Icatu não mostraram efeitos negativos nos dois fotossistemas devido à imposição de estresse hídrico, enquanto as plantas de CL153 mostraram diminuição no transporte de elétrons ao nível do *PSII* (com ou sem o envolvimento do complexo de evolução do oxigênio, *OEC*) e do *PSI*.

No que se refere ao impacto da temperatura nas plantas Ctl, observaram-se efeitos negativos significativos em CL153 apenas a 42/30 °C e no *PSII*, apesar de serem impactos claramente moderados, com decréscimos de 6% (*PSII+OEC*) e 8% (*PSII-OEC*). Em Icatu não se observaram decréscimos significativos em relação à 25/20 °C. Note-se, contudo, que em ambos os genótipos os valores de atividade dos dois fotossistemas aumentaram a 31/25 °C e 37/30 °C em face de 25/20 °C. Desta forma, entre 37/30 °C e 42/30 °C ocorreram normalmente decréscimos significativos da atividade de qualquer dos fotossistemas (mesmo quando não diferiram do valor de 25/20 °C).

A interação de ambas as condições de estresse foi clara em ambos os genótipos e fotossistemas, observando-se decréscimos significativos nas plantas *SD* já a 37/30 °C (exceto no *PSII+OEC* no CL153) e a 42/30 °C (em todos os casos). Desta forma, nota-se que as plantas em condições hídricas favoráveis podem manter melhor funcionamento até nível de temperatura maior que as plantas em estresse hídrico. Contudo, comparativamente às plantas Ctl a 25/20 °C, os valores a 42/30 °C apresentaram decréscimos de 31% (*PSII+OEC*), 38% (*PSII-OEC*) e 31% (*PSI*) em CL153, e 13%, 12% e 20% em Icatu, pela mesma ordem.

De forma imprevista, durante o período de recuperação as plantas Ctl do CL153 mostram um forte decréscimo da atividade dos dois fotossistemas, enquanto as plantas Ctl de Icatu mostram uma total recuperação da actividade medida no *PSII+OEC* e *PSI*. Por outro lado, as plantas expostas a ambos os estresses mostraram uma recuperação incompleta face ao valor observado nas plantas Ctl a 25/20 °C do início do experimento. Tal reflete a permanência de *aftereffects* mesmo após duas semanas de recuperação. Nesta altura os valores

observados nas plantas *SD* mostravam decréscimos de 29% e 26 % (*PSII+OEC*), 35% e 32% (*PSII-OEC*), e 27% e 35% (*PSI*), respectivamente para de CL153 e Icatu.

Transportadores Tilacoidais de Elétrons

Os teores de transportadores de elétrons das membranas tilacóidais mostraram alterações devido aos estresses impostos, de forma diferente nos dois genótipos. De modo geral, a exposição apenas ao estresse hídrico provocou um significativo aumento de todos os transportadores de elétrons em Icatu (duplicando mesmo em relação à *PQ-9*). Já nas plantas de CL153 o impacto foi negativo para todos os citocromos, enquanto para a *PQ-9* se observou um aumento não significativo (Tabela 6).

O aumento de temperatura levou a aumentos de todos os transportadores a 31/25 °C e 37/28 °C nas plantas Ctl em Icatu, especialmente na *PQ-9* que mostrou um aumento de 83% na maior destas duas temperaturas. Já no CL153 apenas o teor de *PQ-9* aumentou, apresentando uma subida máxima de 54% a 37/28 °C. Contudo nessa temperatura ocorreram descidas em todos os citocromos nas plantas CL153-Ctl. A 42/30 °C os teores de transportadores diminuíram em ambos os genótipos, mas ainda assim para valores próximos aos observados a 25/20 °C.

Os resultados obtidos pela exposição simultânea a déficit hídrico severo e ao aumento de temperatura revelaram a existência de uma interação forte em Icatu, e em menor grau no CL153. Neste genótipo, nas plantas *SD* apenas a *PQ-9* decresce (não significativamente) a 42/30 °C em relação aos valores observados a 25/20 °C. Contudo registram-se decréscimos em todos os transportadores a 37/28 °C e 42/30 °C quando a comparação é feita com os valores observados a 31/25 °C. No caso das plantas Icatu-*SD*, os teores de todos os transportadores decrescem gradualmente desde 25//20 °C, atingindo valores mínimos a 37/28 ou 42/30 °C.

Tabela 6. Alterações nos teores de transportadores tilacóidais de elétrons: Plastoquinona (*PQ-9*), Citocromo *b_{559LP}* e Citocromo *b_{559HP}*; e *PSI*: Citocromo *b₅₆₃* e Citocromo *f* em *Coffea canephora* cv. Conilon (CL153) e *Coffea arábica* cv. Icatu submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-CTL) e Seca Severa (*SD*); e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28, 42/30°C, e recuperação ao fim de 14 dias (Rec14). Os valores representam a média ± erro padrão (n=8). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letras minúsculas (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30°C	Rec14
<i>PQ-9</i> (nmol g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	318,1 ± 60,1aB	461,9 ± 83,7aAB	490,6 ± 46,6aA	432,6 ± 36,8aAB	418,6 ± 76,6aAB
	SD	381,0 ± 33,1aAB	542,8 ± 75,0aA	210,5 ± 31,8bC	299,3 ± 22,5bBC	303,7 ± 53,6aBC
Icatu	Ctl	315,2 ± 88,6bB	537,1 ± 76,2aAB	576,9 ± 45,3aA	349,2 ± 36,8aB	451,1 ± 113,5aAB
	SD	637,8 ± 120,8aA	425,8 ± 37,7aAB	209,9 ± 52,3bB	217,5 ± 36,9aB	402,8 ± 36,9aB
<i>Cit b_{559LP}</i> (nmol g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	14,49 ± 0,41aA	13,94 ± 0,23bAB	12,05 ± 0,33aC	13,20 ± 0,18aB	10,18 ± 0,30bD
	SD	10,12 ± 0,23bCD	15,60 ± 0,74aA	9,78 ± 0,27bD	10,86 ± 0,20bC	13,70 ± 0,27aB
Icatu	Ctl	13,49 ± 0,52bC	17,34 ± 0,54aA	15,08 ± 0,90aB	12,52 ± 0,32aC	13,84 ± 0,03aBC
	SD	14,63 ± 0,26aA	12,59 ± 0,16bBC	12,98 ± 0,10bB	11,23 ± 0,32bC	12,40 ± 0,26bBC
<i>Cit b_{559HP}</i> (nmol g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	16,98 ± 0,39aA	16,28 ± 0,21aA	13,88 ± 0,42aC	15,20 ± 0,34aB	11,15 ± 0,22aD
	SD	11,83 ± 0,16bB	16,81 ± 0,27aA	11,23 ± 0,13bB	12,06 ± 0,25bB	11,63 ± 0,25aB
Icatu	Ctl	15,30 ± 0,37bBC	20,25 ± 0,78aA	17,18 ± 1,46aB	14,04 ± 0,33aC	16,15 ± 0,13aAB
	SD	16,69 ± 0,22aA	14,69 ± 0,52bB	12,31 ± 0,26bBC	11,37 ± 0,12bC	11,37 ± 0,33bC
<i>Cit f</i> (nmol g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	16,74 ± 0,54aA	17,18 ± 0,67bA	14,77 ± 0,84aB	14,45 ± 0,28aB	10,27 ± 0,10bC
	SD	13,33 ± 0,09bB	19,31 ± 0,25aA	10,78 ± 0,17bC	12,28 ± 0,44bBC	11,40 ± 0,15aBC
Icatu	Ctl	16,35 ± 0,47bBC	21,07 ± 0,64aA	17,96 ± 0,88aAB	15,85 ± 0,62aBC	14,03 ± 0,25aC
	SD	20,89 ± 0,21aA	15,08 ± 0,62bB	13,42 ± 0,34bBC	12,46 ± 0,21bC	8,27 ± 1,09bD
<i>Cit b₅₆₃</i> (nmol g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	26,22 ± 1,48aA	26,61 ± 1,05aA	23,36 ± 0,95aB	25,33 ± 0,14aAB	17,89 ± 0,36bC
	SD	18,54 ± 0,12bC	25,90 ± 0,36aA	18,02 ± 0,36bC	19,52 ± 0,17bC	22,24 ± 0,32aB
Icatu	Ctl	26,73 ± 1,37aC	34,11 ± 1,07aA	29,27 ± 1,49aB	26,03 ± 0,32aCD	23,38 ± 0,10aD
	SD	28,07 ± 0,23aA	24,16 ± 0,28bB	23,54 ± 0,21bBC	22,57 ± 0,29bBC	21,17 ± 0,24bC

Os impactos nas plantas de Icatu submetidas a ambos os estresses (*SD*) permaneceram parcialmente no final do período de recuperação em relação às plantas Ctl nesse ponto (exceto na *PQ-9*). Contudo, nas plantas Icatu-Ctl todos os transportadores (exceto *Cit b₅₆₃*) mostram valores que não diferem de 25/20 °C no início do experimento. Pelo contrário, as plantas CL153-Ctl apresentam pior recuperação, pois nenhum transportador (exceto *PQ-9*) recuperou integralmente por comparação ao início do experimento. Curiosamente, as plantas *SD* mostraram recuperação total apenas na *PQ-9* e no *Cit b_{559LP}* (por comparação às plantas Ctl a 25/20 °C), mas ainda assim significativamente melhor que as Ctl para os *Cit b_{559LP}*, *f* e *b₅₆₃* em Rec14. Desta forma, as plantas CL153 sujeitas a ambos os estresses apresentaram melhor potencial de recuperação após fim das condições estressantes.

Atividade de Enzimas da Fotossíntese

Complementarmente à análise da fase fotoquímica da fotossíntese (parâmetros de fluorescência, taxas de transporte e transportadores de elétrons), estendeu-se a caracterização dos impactos das condições de estresse à avaliação da atividade de duas importantes enzimas do metabolismo fotossintético, de modo a estudar a sua importância na fase bioquímica da fotossíntese (Tabela 7).

Tabela 7. Atividade Inicial e Total e porcentagem de ativação da ribulose-1,5-bisfosfato

carboxilase oxigenase (RuBisCO), e Atividade da ribulose-5-fosfato quinase (Ru5PK), em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (SD), e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28, 42/30 °C, e recuperação ao fim de 14 dias (Rec14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=6). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letras minúsculas (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	Rec14
Atividade Inicial RuBisCO ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)						
CL 153	Ctl	10,19 \pm 0,28aBC	13,62 \pm 1,89aAB	15,82 \pm 1,76aA	4,28 \pm 0,26aD	8,74 \pm 0,98aC
	SD	6,28 \pm 0,08bA	7,30 \pm 1,25bA	6,64 \pm 0,37bA	1,70 \pm 0,09aB	8,54 \pm 0,22aA
Icatu	Ctl	8,51 \pm 0,97aBC	10,64 \pm 0,53aAB	11,74 \pm 0,97aA	3,74 \pm 0,34aD	8,41 \pm 0,44aC
	SD	7,31 \pm 0,28aAB	6,58 \pm 0,23bB	6,37 \pm 0,32bB	2,33 \pm 0,16aC	9,32 \pm 0,14aA
Atividade Total RuBisCO ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)						
CL 153	Ctl	19,7 \pm 0,9aBC	23,4 \pm 2,2aB	29,0 \pm 1,02aA	10,1 \pm 0,6aD	17,7 \pm 1,3aC
	SD	14,2 \pm 0,1bAB	11,8 \pm 1,4bB	13,3 \pm 0,87bB	3,5 \pm 0,2bC	18,5 \pm 0,2aA
Icatu	Ctl	16,4 \pm 1,1aC	21,2 \pm 0,5aB	24,2 \pm 0,64aA	6,8 \pm 0,6aE	13,5 \pm 0,6bD
	SD	14,4 \pm 0,4bB	12,5 \pm 0,1bBC	11,2 \pm 0,39bC	3,8 \pm 0,2bD	17,8 \pm 0,3aA
Ativação RuBisCO (%)						
CL 153	Ctl	52,6 \pm 3,3aAB	57,3 \pm 3,1aA	54,0 \pm 5,0aA	42,5 \pm 0,5aB	48,3 \pm 2,4aAB
	SD	44,2 \pm 0,8bB	61,1 \pm 4,4aA	50,1 \pm 0,9aAB	49,8 \pm 1,7aB	46,3 \pm 1,2aB
Icatu	Ctl	51,2 \pm 3,2aAB	50,1 \pm 2,1aAB	48,3 \pm 3,2aB	55,2 \pm 1,2aAB	64,7 \pm 6,6aA
	SD	50,6 \pm 0,9aAB	41,9 \pm 11,8aB	56,6 \pm 1,7aAB	60,9 \pm 2,6aA	52,5 \pm 0,7bAB
Atividade Ru5PK ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)						
CL 153	Ctl	97,7 \pm 7,4aB	105,6 \pm 2,8aB	120,8 \pm 2,4aA	32,8 \pm 0,5aD	74,4 \pm 6,0bC
	SD	95,5 \pm 3,1aA	69,4 \pm 1,2bB	69,6 \pm 1,3bB	15,4 \pm 1,7bC	106,8 \pm 2,7aA
Icatu	Ctl	78,1 \pm 2,8aC	110,4 \pm 3,2aA	102,8 \pm 6,9aAB	36,5 \pm 1,2 aD	86,4 \pm 7,5bBC
	SD	71,3 \pm 1,6aB	79,0 \pm 3,6bB	41,1 \pm 2,3bC	19,5 \pm 2,6bD	101,8 \pm 2,3aA

Observou-se que a exposição apenas à seca severa diminuiu significativamente as atividades inicial (38%) e total (28%), assim como o estado de ativação (8%) da RuBisCO nas plantas de CL153, enquanto nas Icatu apenas a atividade total decresce (12%). A Ru5PK não foi significativamente afetada em ambos os genótipos.

O aumento da temperatura (plantas Ctl) levou a um forte aumento das atividades da RuBisCO (inicial e total) e da Ru5PK até 37/28 °C em ambos os genótipos. Nesta temperatura, os aumentos atingiram 55% e 38% na atividade inicial, 47% na atividade total, ambas da RuBisCO, e 24% e 32% na atividade da Ru5PK, para CL153 e Icatu respectivamente. Contudo, a 42/30 °C a atividade de ambas as enzimas foi fortemente afetada em ambos os genótipos, com decréscimos entre 48% (atividade total RuBisCO em CL153) e 66% (atividade Ru5PK em CL153) quando comparados com a temperatura inicial de 25/20 °C. Esses decréscimos são ainda superiores, entre 65% (atividade total RuBisCO em CL153) e 73% (atividade inicial RuBisCO ou Ru5PK em CL153), quando comparados com a

temperatura de 37/30 °C. O estado de ativação da RuBisCO manteve-se até 37/28 °C, diminuindo a 42/30 °C apenas em CL153.

Até 37/28 °C não existe interação óbvia dos dois estresses para a actividade RuBisCO, mas existe para a da Ru5PK que foi reduzida nas plantas *SD* de ambos os genótipos, por comparação aos valores das plantas *SD* a 25/20 °C. Contudo, a 42/30 °C essa interação é clara para ambas as enzimas e genótipos, tendo as plantas *SD* atingido os valores mínimos de actividade observados no experimento. Nestas condições (42/30 °C e *SD*) a redução face ao controle (25/20 °C, Ctl) foi de 83%, 82% e 84% para as actividades inicial e total da RuBisCO e Ru5PK em CL153, e de 73%, 77% e 75%, pela mesma ordem em Icatu. Estas reduções foram ainda maiores, entre um mínimo de 80% (actividade inicial RuBisCO em Icatu) e um máximo de 89% (actividade inicial RuBisCO em CL153), se a comparação for com as respectivas plantas Ctl a 37/28 °C. Entre genótipos, em todos os casos as maiores reduções de actividade a 42/30 °C nas plantas *SD* foram observadas nas plantas CL153. O estado de ativação manteve-se sem alterações significativas.

Duas semanas após a reposição da disponibilidade hídrica e temperatura adequadas, as actividades enzimáticas recuperaram na totalidade em ambos os genótipos (exceto na actividade total da RuBisCO em Icatu-Ctl) e independentemente das condições a que as plantas foram anteriormente expostas. Contudo nota-se que as plantas Icatu-*SD* tenderam para valores mais altos que as Ctl em Rec14 e no início do experimento a 25/20°C.

Permeabilidade Membranar

A permeabilidade das membranas celulares aumentou significativamente nos dois genótipos após submissão à seca, embora para valores moderados. Deve-se destacar que o aumento de temperatura não teve impacto neste parâmetro nas plantas Ctl de CL153 e Icatu ao longo de todo o experimento, inclusive na temperatura máxima de 42/30 °C. A interação de estresses esteve ausente em Icatu, enquanto nas plantas de CL153-*SD* ocorreu apenas a 42/30 °C (aumento de 240% em comparação as plantas Ctl a 25/20 °C).

Tabela 8. Permeabilidade das membranas celulares em nas folhas de plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon CL153 e *Coffea arabica* cv. Icatu submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (*SD*); e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28 e 42/30 °C, e recuperação ao fim de 14 dias (Rec14). Os valores representam a média ± erro padrão (n=X). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letras minúsculas (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise

foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	Rec14
		Perda de eletrólitos (%)				
CL 153	Ctl	12,2 ± 0,6bA	13,2 ± 2,1bA	11,5 ± 1,7bA	14,5 ± 2,2bA	13,2 ± 2,3 bA
	SD	28,3 ± 2,5aB	25,0 ± 5,9aB	27,0 ± 4,3aB	41,6 ± 3,9aA	20,9 ± 3,4aB
Icatu	Ctl	10,3 ± 0,9bA	8,9 ± 0,5bA	9,4 ± 0,7bA	13,4 ± 0,6bA	15,2 ± 1,6bA
	SD	21,3 ± 2,9aA	19,8 ± 4,0aA	16,1 ± 1,2aA	19,6 ± 2,8aA	19,7 ± 4,2 aA

Em Rec14 observou-se a manutenção de valores aumentados nas plantas *SD* de ambos os genótipos, semelhantes aos observados no início do experimento quando as plantas estavam efetivamente submetidas a déficit hídrico. Desta forma o efeito da seca permaneceu ao nível da seletividade das membranas devido a uma incompleta recuperação (revelando ainda impacto negativo, como sugerido pelos dados de MDA, Cap. 5) e/ou a alterações na composição das membranas (como resposta de aclimação).

DISCUSSÃO

Caracterização Hídrica Foliar

O potencial hídrico da folha (Ψ) expõe seu estado energético, cujos gradientes explanam o fluxo de água no sistema solo-planta-atmosfera. Sendo próximo a zero quando a água está disponível em abundância, diminuindo para valores mais negativos quando a água se torna mais escassa (MELO et al., 2014).

O estabelecimento inicial do nível de estresse hídrico levou a valores contrastantes de Ψ_{pd} entre as plantas bem regadas e de estresse hídrico severo. De fato, em temperatura adequada (25/20 °C) os valores para Ctl foram de -0,31 e -0,34 MPa vs. -3,85 e -3,69 MPa, para CL153 e Icatu, respectivamente, correspondendo a valores de RWC_{pd} de 91,1 e 96,2 vs. 57,5% e 60,7%. Estes valores de Ψ_{pd} situam-se abaixo -3,5 MPa considerado como déficit hídrico extremo em cafeeiros (BRUM e MELO, 2013) e bem abaixo dos -2,15 MPa necessário para provocar murchidão da folha após período de 14 dias sem irrigação (SANTOS e MAZZAFERA, 2012). Estão também próximos do valor de -4,06 MPa em plantas oriundas de mudas de estacas com o solo a 20% da capacidade de campo (DOMINGUETTI et al., 2016).

A imposição do aumento de temperatura por si só, originou uma pequena desidratação nas plantas Ctl que atingiram valores de Ψ_{pd} de -0,71 MPa a 42/30 °C em ambos os genótipos, mas sem impacto no valor de RWC_{pd} que se manteve perto de 95%, acima portanto do ponto de perda de turgescência foliar que é geralmente próximo a 90% (DaMatta e Ramalho, 2006). Estudos mostram que valores de Ψ_{pd} na ordem de -1,0 ou -1,5 MPa, não

são suficientes para reduzir taxas fotossintéticas em café (DAMATTA e RAMALHO, 2006; BATISTA et al., 2010; RONCHI et al., 2015), sugerindo ser esse um valor limite, para a não ocorrência de distúrbios fisiológicos na planta, em condições normais de cultivo (MELO et al., 2014; DOMINGUETTI et al., 2016). Desta forma, eventuais impactos das altas temperaturas na fotossíntese não estarão relacionados com uma possível desidratação foliar, apesar do forte aumento do fluxo transpiratório (Tabela 3), já que o RWC_{pd} é um importante indicador do estado da água nas plantas, refletindo o equilíbrio entre o suprimento de água ao tecido foliar e a taxa de transpiração (SOLTYS-CALINA et al., 2016). Tais impactos em alta temperatura terão antes a ver com perturbações e/ou danos provocados no funcionamento metabólico, estruturas celulares (e do cloroplasto), o nos mecanismos de controle de ROS (MARTINS et al., 2016).

Já a conjugação de estresses promoveu decréscimo de Ψ_{pd} e RWC_{pd} . De fato, a 42/30 °C observaram-se valores de Ψ_{pd} de -4,38 e -4,14 MPa, e valores mínimos de RWC_{pd} de 55,2 e 47,3% em CL153 e Icatu, respectivamente (Tabela 1), *i.e.*, refletindo uma limitação hídrica de severidade agravada com a sobreposição dos dois estresses quando comparada com a exposição individual a cada um deles. Tal poderá ter agravado o impacto sobre os processos vitais de crescimento celular, implicando inclusive desidratação do protoplasma (PELOSO et al., 2017). Ressalta-se que o baixo conteúdo relativo de água foliar pode predispor as folhas ao dano fotoinibitório (ZLATEV, 2009). De fato, a diminuição do conteúdo hídrico das folhas induz o fechamento dos estômatos, impondo uma diminuição do acesso de CO₂ ao cloroplasto, o que diminuirá o uso de energia pelo processo fotossintético e uma diminuição da taxa de fotossíntese (BAKER e ROSENQVIST, 2004; HAWORTH et al., 2018), como ocorreu no nosso estudo (Tabela 3).

Características Estomáticas

A anatomia foliar do cafeeiro pode ser modificada conforme a radiação solar, temperatura, disponibilidade de água e nutrientes no solo, incluindo ao nível das dimensões, densidade e índice estomático de forma a que planta tenha um bom desenvolvimento (GRISI et al., 2008; BATISTA et al., 2010; BALIZA et al., 2012; MELO et al., 2014; GAMA et al., 2017).

Os nossos resultados mostram que a alta temperatura e o déficit hídrico promoveram mudanças nas características estomáticas de maneira dependente da espécie (Tabela 2). Apesar de uma tendência para aumentar, a densidade estomática de CL153 não sofreu alterações significativas com a seca, mas diminuiu em Icatu. Neste genótipo os resultados

estão de acordo com as observações em *C. arabica* cv. Siriema que mostram um decréscimo da densidade estomática em seca (MELO et al., 2014). No nosso caso, estas alterações foram acompanhadas de um decréscimo (CL153) ou aumento (Icatu) do tamanho dos estômatos (Tabela 2). A diminuição no tamanho dos estômatos em ambientes com menor disponibilidade hídrica é usualmente interpretado como benéfico para a planta, pois pode diminuir a perda de água transpirada e aumentar a eficiência do seu uso (GRISI et al., 2008; BATISTA et al., 2010). Entretanto, Zhang et al. (2006) relataram que o comprimento dos estômatos aumentou sob condições limitantes de irrigação, enquanto sua largura diminuiu. Logo, diferentes efeitos de fatores abióticos no tamanho dos estômatos podem depender de espécies/variedades de plantas (XU e ZHOU, 2008), pelo que o comportamento estomático pode ser usado na escolha de cultivares/variedades com características de tolerância a estresse abiótico.

Adicionalmente, a densidade estomática aumentou gradualmente em CL153 com o calor (com o valor máximo a 42/30 °C), enquanto em Icatu os valores se mantiveram até 37/28 °C, e decresceram a 42/30 °C, não se observado alteração após a reposição de condições adequadas. Tal confirma resultados anteriores da exposição de plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clones 02 e 153 e *C. arabica* cv. Icatu, e Catuaí 62 a temperaturas elevadas, tanto em experimentos em condições ambientais controladas (RODRIGUES et al., 2016), como considerando a variação sazonal de temperatura entre a Primavera e o Verão (RODRIGUES et al., 2018). Com o aumento da temperatura também o tamanho dos estômatos, diminuiu em CL153, mas manteve-se em Icatu, confirmando as observações de Rodrigues et al. (2016). Estes resultados mostram diferentes impactos entre estas duas (próximas) espécies, o que está de acordo com o fato das respostas estomáticas de curto e longo prazo a temperaturas mais altas poderem ser específicas da espécie (HAWORTH et al., 2018a; WU et al., 2018).

Considerando a temperatura de 37/28 °C (antes das plantas serem claramente afetadas a 42/30 °C em vários parâmetros), a manutenção (Icatu) e aumento (CL153) da densidade estomática, a par da diminuição do tamanho (ambos os genótipos), parecem estar em linha (principalmente no CL153), com a redução (Icatu) e aumento (CL153) de g_s (Tabela 3). Os estômatos controlam as trocas gasosas foliares através de um equilíbrio entre as necessidades de CO₂ para a fotossíntese e o nível de disponibilidade hídrica, com o tamanho e a densidade estomática a determinarem a condutância difusiva máxima na folha para o CO₂. De fato, uma maior densidade estomática de estômatos de menor dimensão aumentará a g_s para uma mesma área total de poros estomáticos, devido a uma menor distância de difusão a percorrer pelo vapor de água (FRANKS e BEERLING, 2009), o que concorda com o que se

observou em CL153 (que tem um aumento de g_s) a 37/28 °C. Deve, contudo notar-se que CL153 apresenta aumento da densidade estomática e menor tamanho de estômatos a 31/25 e 37/28 °C sem aumento de g_s tal como também observado previamente (XU e ZHOU, 2008, RODRIGUES et al., 2018), o que se poderá explicar por uma maior influência do componente de abertura dos próprios estômatos que ultrapasse o efeito das alterações de densidade e tamanho, como sugerido suceder em para *C. arabica* cv. IPR108 (RODRIGUES et al., 2016).

Por último, relativamente à densidade estomática notou-se que a resposta à imposição de ambos os estresses foi de alguma forma modificada quando comparada com a presença de cada estresse de forma individual, pelo menos a 42/30 °C. Nesta temperatura continua a observar-se uma subida da densidade estomática nas plantas CL153-SD, mas atenuada, enquanto nas plantas Icatu-SD continua a existir uma descida, mas agora mais acentuada. Por outro lado o tamanho dos estômatos não é tão reduzido nas plantas CL153-SD relativamente às plantas Ctl a 42/30 °C, e nas plantas de Icatu-SD este parâmetro desce um pouco mais (embora não significativamente) do que nas plantas Ctl. Assim, tal como para diversos outros parâmetros estudados, a presença de ambos os estresses modifica a resposta destes genótipos ao nível das características estomáticas.

O comportamento do índice estomático mostrou apenas pequenas flutuações em relação à exposição à seca e/ou temperatura alta nos dois genótipos, confirmando resultados prévios (RODRIGUES et al., 2016). De fato, esta característica é razoavelmente constante para uma dada espécie, podendo ser afetada, por exemplo, pela umidade atmosférica (GRISI et al., 2008).

Impactos ao Nível do Funcionamento da Fotossíntese

O desempenho global do processo fotossintético está dependente de um equilíbrio de condições ambientais, sendo que a seca e temperatura (principalmente o calor, mas também o frio) são as condições que mais afetam o cafeeiro e a sua produção (DAMATTA e RAMALHO, 2006; RAMALHO et al., 2014; MARIAS et al., 2017). Uma das primeiras respostas do cafeeiro para minimizar a perda de água pela transpiração em condições de estresse hídrico passa pela redução da abertura estomática (BATISTA et al. 2010; MELO et al., 2014; RONCHI et al., 2015). A resistência estomática é simultaneamente afetada por vários fatores ambientais, no entanto, o fechamento estomático evita a ocorrência de danos aos sistemas metabólicos, ajustando-os ao déficit hídrico da planta, resultando na manutenção temporária do funcionamento metabólico.

Os nossos resultados relativos às trocas gasosas foliares mostram um impacto

fortíssimo da seca severa em todos os parâmetros avaliados (Tabela 3), apresentando, nomeadamente, reduções de 82% e 92% na P_n , de 75% e 77% na g_s e mesmo de 41% e 21% em A_{max} , para CL153 e Icatu, respectivamente. A conjugação destes resultados mostra a existência de estomáticos e não estomáticos (ao nível do mesófilo) na fotossíntese. Cavatte et al. (2012) reportam decréscimos de P_n de 43-46% e g_s de 52-60%, em cafeeiros arábica submetidos a uma baixa disponibilidade de água no solo, associada a uma maior demanda evaporativa da atmosfera. O decréscimo de P_n foi associado, principalmente, ao fechamento estomático, que ao preservar a H_2O reduziu a disponibilidade de CO_2 nos sítios de carboxilação da RuBisCO nos cloroplastos (DAMATTA e RAMALHO, 2006; PELOSO et al., 2017).

Por outro lado, o impacto do aumento da temperatura em plantas com total disponibilidade hídrica (Ctl) foi muito menor que o da seca, observando-se importantes decréscimos de P_n a partir de 39/30 °C (CL153) e 34/28 °C (Icatu), que acompanharam as variações de g_s e sem decréscimos de A_{max} até 37/28 °C. Contudo, forte impacto foi observado a 42/30 °C, inclusive em A_{max} , tal como observado anteriormente (RODRIGUES et al., 2016). Mesmo a 42/30 °C nas plantas Ctl a P_n foi reduzida 78% (CL153) e 44% (Icatu), mas A_{max} mostrou impactos de em 51% (Icatu) e 31% (CL153, não significativo). Esses achados refletem uma tolerância a temperaturas bem acima daquelas consideradas adequadas para a safra de café, e a manutenção de funcionamento fotossintético relevante (ainda que com forte impacto) mesmo a 42/30 °C, sendo geralmente aceite que *C. canephora* tem maior tolerância ao calor do que *C. arabica* (DAMATTA e RAMALHO, 2006), o que concordam com estes resultados.

De 37/28 °C a 42/30 °C a taxa de transpiração (E) sobe fortemente, apesar de este gasto de água nem sempre ser acompanhado de maior g_s , explicado pela maior déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha (HAWORTH et al., 2018a,b). De acordo com Wahid et al. (2007) a nível das folhas, o estresse de alta temperatura reduz a fotossíntese, aumenta a fotorrespiração e a respiração mitocondrial e influencia as relações hídricas e a condutância estomática.

A presença concomitante de ambos os estresses promoveu impactos mais profundos nos parâmetros de trocas gasosas foliares. Em geral, as plantas abrem seus estômatos para diminuir a temperatura das folhas pela transpiração quando submetidas a temperaturas elevadas do ar (como visto parcialmente em nossos resultados), mas são incapazes de fazer o mesmo quando submetidas à seca e ao calor, simultaneamente, para evitar maiores perdas de água. Como resultado, a temperatura das folhas permanece alta (BARNABAS et al., 2008;

JIN et al., 2016). A seca e o calor impostos simultaneamente podem influenciar os sinais que controlam as trocas gasosas (PRASCH e SONNEWALD, 2013). De fato, nos dois genótipos em estudo, a imposição simultânea de ambos os estresses revelou-se muito penalizante, com severas reduções de P_n , g_s , E e $iWUE$ pelo que a baixa g_s limitará (pelo menos parcialmente) P_n . Contudo, o decréscimo de A_{max} e o aumento considerável na concentração interna de CO_2 (C_i) (Tabela 3), mostram que não há limitação de CO_2 para a RuBisCO pelo que nestas condições (SD e 42/30 °C) as limitações não-estomáticas terão igualmente um importante peso na limitação da fotossíntese. Tal está de acordo com afirmações de que o efeito da combinação de calor e seca é mais prejudicial sobre o crescimento e a produtividade das culturas, em comparação com os estresses individuais de seca e calor (MARIAS et al., 2017; DUBBERSTEIN et al., 2018, SEMEDO et al., 2018; HOWARTH et al., 2018a). Para as plantas SD dos genótipos, os valores de P_n foram negligíveis (ou negativos) desde 28/23 °C até 42/30 °C (durante 42 a 49 dias), o que poderá estar ligado a valores muito baixos de g_s durante esse período (o que não impediu algum aumento de E). De fato, deve-se destacar a relevante tolerância mesofílica a ambos os estresses, tendo em conta que A_{max} das plantas SD se manteve até 37/28 °C em relação à temperatura controle, e que pouco difere das plantas Ctl na temperatura máxima. Neste ponto Icatu-SD tem um valor inferior ao início do experimento. A tolerância a estes estresses (individuais ou em conjunto) fica ainda refletida na total recuperação de A_{max} já em Rec4 para Icatu e Rec7-10 para CL153, pelo que a incompleta recuperação de P_n nestas alturas se deverá a limitação da g_s (principalmente nas plantas SD). Lavouras cafeeiras cultivadas em zonas tropicais normalmente passam por períodos com temperaturas mais elevadas. Dubberstein et al. (2017) verificaram menores taxas de crescimento vegetativo anual de cafeeiros Conilon quando ocorrido período de seca e temperatura máxima de até 34 °C. O mesmo comportamento foi observado por Partelli et al. (2013) a temperaturas acima de 34 °C (até 38 °C) no norte do Estado do Espírito Santo. Contudo a retoma da atividade de crescimento ocorreu após esse período, o que está de acordo com a tolerância aqui observada.

Assim, como foi visto, a maioria dos parâmetros fotossintéticos de trocas gasosas exibiram inequívoca tolerância aos estresses (mais em CL153) e mostraram uma rápida capacidade de recuperação (mais em Icatu) após reestabelecimento dos níveis hídricos e temperaturas ideais, evidenciando que o cafeeiro apresenta uma resiliência interessante aos estresses ambientais, principalmente aqueles relacionados à escassez de água e temperatura (DAMATTA e RAMALHO, 2006; RAMALHO et al., 2014). Deve salientar-se que tal foi também observado para a submissão simultânea a frio e seca, tendo as plantas submetidas a

ambos os estresses sido menos afetadas devido à presença de mecanismos de resposta cruzados que permitem um controle mais efetivo da produção de *ROS* (RAMALHO et al., 2018) . De acordo com Song et al. (2014) a maior parte desse processo é controlada pela expressão de diversos genes com variados fatores de transcrição.

Complementarmente à avaliação dos parâmetros (mais globais) de trocas gasosas foliares, a alteração da emissão de fluorescência pela Chl *a* podem proporcionar informação mais detalhada sobre possíveis impactos, nomeadamente, nos eventos de captura da energia da luz e seu processamento fotoquímico, indicando alterações no estado funcional das membranas dos tilacóides e o eventual reforço de processos de fotoproteção ou da existência de fotoinibição da maquinaria fotossintética quando as plantas são expostas a estresse ambientais (bióticos ou abióticos) (BAKER e ROSENQVST, 2004; KONRAD et al., 2005; SONG et al., 2014). Foi esse o caso em diversos trabalhos envolvendo as respostas de *Coffea* spp. relativamente a estresses de irradiância, nitrogênio, frio e calor (NUNES et al., 1993; RAMALHO et al., 2000; 2003; CHAVES et al., 2008; BATISTA-SANTOS et al., 2011; CAVATTE et al., 2012; RODRIGUES et al., 2016). Os nossos resultados confirmam isso, pois, a maioria dos parâmetros foi afetada pelas condições de estresse, fornecendo informação importante na avaliação da tolerância/sensibilidade da maquinaria fotossintética (Tabela 4).

F_o é a fluorescência mínima quando Q_A (quinona receptora primária de elétrons do *PSII*) está totalmente oxidada e o centro de reação do *PSII* está aberto, antes de qualquer reação fotoquímica (BAKER e ROSENQVST, 2004; KONRAD et al., 2005; ZLATEV, 2009). Apesar de algumas flutuações, os valores de F_o e F_v/F_m mantiveram-se estáveis na plantas submetidas à seca (exceto para o segundo em CL153), e à temperatura até 39/30 °C quando os estresses foram aplicados individualmente. Tal reflete uma tolerância até temperaturas bastante altas ao nível das antenas e da eficiência fotoquímica do *PSII*. Apenas a 42/30 °C os valores de F_o (aumentam) e F_v/F_m (decrecem, particularmente nas plantas Icatu-Ctl) foram significativamente alterados, confirmando resultados recentes que mostram que a esta temperatura o limite de tolerância foi ultrapassado (MARTINS, et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016). O F_v/F_m tem sido utilizado para detectar perturbações no sistema fotossintético causada por estresses ambientais, pois a sua diminuição indica a regulação negativa da fotossíntese ou fotoinibição (KONRAD et al., 2005; ZLATEV, 2009; SANDA et al., 2011; NOURI et al., 2015). Adicionalmente, o aumento de F_o e a diminuição na F_v/F_m em simultâneo tem sido utilizada para avaliar as respostas de diversas culturas agrícolas à alta temperatura (BAKER e ROSENQVIST 2004), pois indicam ter sido atingido o limiar de tolerância ao dano, relacionado com fotoinibição do *PSII*. Por outro lado, como a 42/30 °C os

valores de A_{max} foram diminuídos, o aumento de F_o ligado à redução de F_v/F_m indicará, mais que uma regulação a presença de fotoinibição dos centros de reação do *PSII* (com possível impacto ao nível da proteína D1) (SILVA et al., 2015; PELOSO et al., 2017), tal como sugerido ocorrer em cafeeiros em condições de alta irradiância (RAMALHO et al., 2000) e calor (RODRIGUES et al., 2016). Esta interpretação sustenta-se ainda na manutenção de valores de inativação do *PSII* (F_s/F_m') e da eficiência fotoquímica do *PSII* (F_v'/F_m') à luz até 39/30 °C, e do seu aumento e diminuição, respectivamente, nas plantas Ctl de ambos os genótipos a 42/30 °C (quando A_{max} também diminuiu, particularmente em Icatu). Contudo, deve salientar-se que mesmo após um período de 2 semanas de recuperação F_o , F_v/F_m e F_s/F_m' mostram valores algo diferentes dos registados no início do experimento.

A implementação simultânea dos dois estresses não parece ter levado a um agravamento claro do impacto na fotossíntese, conforme avaliado por estes parâmetros, tendo, em conta que a 39/30 °C as plantas *SD* mantiveram valores semelhantes às Ctl (F_o , F_v/F_m), ou que pelo menos não mostraram aumentos relativamente às plantas *SD* a 25/20 °C (F_v'/F_m' , F_s/F_m'). Adicionalmente, a 42/30 °C os maiores aumentos de F_o (ambos os genótipos) e decréscimo de F_v/F_m (Icatu) ocorreram nas plantas Ctl.

Complementarmente foram ainda avaliados diversos parâmetros em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese. Uma maior taxa de transporte de elétrons ($Y_{(II)}$) e eficiência fotoquímica real (F_v'/F_m') são as características fotossintéticas de resistência ao estresse (LI et al., 2017), pois quanto menor for o valor de F_v'/F_m' , menor será a eficiência máxima fotoquímica do *PSII* (OLVERA-GONZALEZ et al., 2013). Por seu lado, um decréscimo significativo de $Y_{(II)}$ evidenciará que uma menor quantidade de energia de excitação foi utilizada para a síntese de ATP (adenosina trifosfato) e NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) nos cloroplastos (PELOSO et al., 2017). Adicionalmente, o *quenching* fotoquímico (aqui representado por q_L) é considerado um indicador do estado redox do *PSII* (MURCHIER E LAWSON, 2013), que estima a fração de centros *PSII* abertos e a proporção de energia de excitação captada por centros de reação abertos e usada para transporte eletrónico (GONZALEZ MORENO et al. 2008). Quanto maior o seu valor, maior o número de centros de reação abertos que a planta possui (OLVERA-GONZALEZ et al., 2013), refletindo melhor o uso de luz pela planta. Este conjunto de parâmetros ($Y_{(II)}$, F_v'/F_m' , q_L), relacionados com o uso de energia para eventos fotoquímicos, mostrou em geral um padrão de variação comum. Todos eles mostram impacto da seca (a 25/20 °C), ausência de impacto significativo da temperatura (Ctl) até 37/28 °C (e mesmo 39/30 °C), decréscimos a 42/30 °C (excepto q_L), e ausência de interação de estresses na exposição à temperatura

máxima (por comparação com as plantas *SD* a 25/20 °C), apesar de normalmente as plantas Ctl apresentarem menor impacto (excepto F_v'/F_m' em Icatu). Estes resultados mostram assim que as folhas mantêm níveis de funcionamento fotoquímico quase inalterados até 37/28 °C ou mesmo 39/30 °C, portanto ainda acima do que recentemente foi reportado (MARTINS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016). Sublinha-se ainda atividade relevante mesmo a 42/30 °C, e severa de restrição hídrica ao nível dos centros de reação de *PSII* (ZLATEV, 2009).

Outro conjunto de parâmetros de fluorescência são utilizados como indicadores dos processos de dissipação de energia em excesso ao nível do *PSII*, a saber $Y_{(NPQ)}$, $Y_{(NO)}$ e q_N . Aumentos significativos de $Y_{(NPQ)}$ e q_N sugerem o aumento da proporção de dissipação de energia na forma de calor relativamente ao seu uso em eventos fotoquímicos, com efeitos negativos na fotossíntese (PELOSO et al., 2017). Contudo, o aumento destes parâmetros é indicativo da presença de mecanismos de proteção e de regulação do *PSII*. De fato, a dissipação térmica do excesso de energia de excitação é uma importante resposta fotoprotetora, pois ajudará a controlar (diminuir) o número de moléculas de clorofila no estado excitado (Chl*) (SANDA et al., 2011; CAZZANIGA et al., 2013; GURURANI et al., 2015; MISHRA et al., 2016; DALAL e TRIPATHY, 2018). Por outro lado, o $Y_{(NO)}$, reflete o *quenching* não-fotoquímico relacionado com fotoinativação e dissipação desregulada/descontrolada de energia pelo *PSII* (KRAMER et al., 2004; BUSCH et al., 2009; HUANG et al., 2011). Assim, o aumento de $Y_{(NO)}$ constituirá uma indicação da existência de limitações no uso da luz incidente devido ao menor uso em processos fotoquímicos ($Y_{(II)}$) e/ou insuficiência dos mecanismos fotoprotetores de dissipação controlada da energia em excesso ($Y_{(NPQ)}$) (HUANG et al., 2011; RODRIGUES et al., 2016).

Tendo isto em conta, observou-se que a imposição de seca aumentou de forma clara os mecanismos de fotoproteção, refletidos nos aumentos de $Y_{(NPQ)}$ e q_N , que assim foram suficientes para impedir a existência do aumento de fotoinativação, como refletido na manutenção (e até tendência para decrescer) de $Y_{(NO)}$, em ambos os genótipos. Tal está igualmente de acordo com a noção que os valores de $Y_{(NO)}$ são normalmente estável em condições de estresses ambientais (BUSCH et al., 2009), aumentando apenas em situações graves (RODRIGUES et al., 2016), o que não terá sido o caso na exposição às condições de seca severa implementadas no nosso estudo. É igualmente muito relevante que até 39/30 °C os valores de $Y_{(NPQ)}$, $Y_{(NO)}$ e q_N não apresentaram variações significativas nas plantas Ctl. Adicionalmente, a 42/30 °C, o decréscimo de $Y_{(II)}$ nestas plantas refletiu-se num aumento de $Y_{(NPQ)}$ (e q_N) mas não de $Y_{(NO)}$ (exceto em Icatu-Ctl). Por fim deve também destacar-se que, mesmo em condições de submissão a ambos os estresses em simultâneo, as plantas *SD*

(ambos os genótipos) a 42/30 °C mantiveram os valores de $Y_{(NO)}$, enquanto $Y_{(NPQ)}$ e q_N atingiram valores máximos (apesar de perto da saturação), protegendo as folhas dos danos decorrentes do excesso de excitação das clorofilas (POMPELI et al., 2010; SILVA et al., 2015).

No seu conjunto, estes resultados mostram uma clara eficiência dos mecanismos de fotoproteção em detrimento do aparecimento de danos irreversíveis, o que está de acordo com a já referida (relativamente) rápida recuperação de A_{max} (primeiro em Icatu e depois em CL153). Tais mecanismos de dissipação terão contado com os mecanismos de quenching de alta energia (q_E), o componente rápido de (e integrado em) q_N , e a participação de pigmentos fotoprotetores (por exemplo, zeaxantina, luteína, β -caroteno) que dissipam termicamente a energia de excitação das moléculas excitadas de clorofila e de oxigênio, promovendo a proteção das antenas (zeaxantina, luteína) e dos centros de reação (β -caroteno) onde se encontram localizados (ver Cap. 5). De fato, o reforço destes mecanismos constitui uma resposta transversal do cafeeiro a diversos estresses ambientais, sendo parte integrante das respostas que permitem uma efectiva aclimação de *Coffea* spp., nomeadamente a baixas temperaturas (RAMALHO et al., 2003; BATISTA-SANTOS et al., 2011; RAMALHO et al., 2014), calor (MARTINS et al., 2016), seca (RAMALHO et al., 2018) e alta irradiância (RAMALHO et al., 2000), tendo igualmente atuado nas condições aqui impostas.

Em resumo, sabendo que as membranas tilacóidais são particularmente sensíveis ao calor e que impactos ao nível fotoquímico estão entre os primeiros indicadores da sensibilidade, com danos ao nível do *PSII* e da ultraestrutura do cloroplasto (MANO, 2002), é muito importante a manutenção do funcionamento fotoquímico nas folhas de cafeeiros até 37/28 °C (e mesmo 39/30 °C) quando submetidas apenas ao aumento de temperatura. É igualmente relevante que para estas temperaturas e mesmo para 42/30 °C não houve agravamento pela exposição combinada de temperatura e seca em nenhum dos parâmetros de fluorescência avaliados quando comparados com os valores das plantas *SD* a 25/20 °C, para ambos os genótipos. Contudo, deve-se de referir que em alguns, poucos, casos as plantas *Ctl* foram mais afetadas que as *SD* a 42/30 °C, como em F_o (ambos os genótipos) e F_v/F_m (Icatu). Por último, ganha especial relevo, que a diminuição da capacidade do uso fotoquímico de energia ($Y_{(II)}$ e q_L) foi compensada com aumentos de $Y_{(NPQ)}$ (e q_N) mas não de $Y_{(NO)}$, reflectindo o reforço de mecanismos de fotoproteção em detrimento da ocorrência de danos.

No período de recuperação apesar de algumas pequenas diferenças, não se vislumbrou diferenças entre as plantas *Ctl* e *SD*, houve recuperação incompleta nalguns casos (por exemplo, F_v/F_m , F_s/F_m' , $Y_{(II)}$, q_L) em ambos os genótipos, e as plantas de Icatu

recuperaram mais rapidamente que as de CL153 em certos parâmetros (F_v'/F_m' , q_N), como já havia sucedido, por exemplo, em P_n e A_{max} .

Transporte Tilacoidal de Elétrons – Taxas e Transportadores

Os principais elementos transportadores de elétrons da cadeia tilacoidal incluem o *PSII*, a plastoquinona, o complexo citocromo *b₆f* e plastocianina, e o *PSI*, que fazem parte do chamado “esquema em Z”. Neste processo, as duas reações de captação de energia luminosa operam em série, através das quais os elétrons extraídos da água ao nível do *PSII* são transferidos através do *pool* de plastoquinonas, complexo citocromo *b₆f* (Cit *b₅₆₃* e Cit *f*) e plastocianina até ao *PSI* e, finalmente, deste para ferredoxina, tendo como aceitador final dos elétrons o NADP^+ (produzindo NADPH). Essas reações de transferência de elétrons são acopladas ao bombeamento de prótons para o lúmen dos tilacóides criando um gradiente electroquímico (de H^+) que é subsequentemente utilizado para produzir ATP pela ATPase das membranas dos tilacóides (ROCHAIX, 2011).

Os componentes da cadeia de transporte de elétrons podem ser afetados sob condições de estresse abiótico (NOURI et al., 2015), nomeadamente por estarem perto da produção de moléculas altamente excitadas, quer de Chl quer de oxigénio, com produção, por exemplo, de *ROS* nos dois fotossistemas, já que em condições metabólicas normais 10 a 30% do transporte tilacoidal de elétrons pode resultar na fotoredução de O_2 (LOGAN, 2005; FORTUNATO et al., 2010). Desta forma, mudanças nos parâmetros ambientais podem afetar tanto as taxas de transporte fotossintético de elétrons como a atividade das enzimas do ciclo de Calvin-Benson (SCHÖTTLER et al., 2015).

As taxas de transporte de elétrons nos tilacóides que envolvem ambos fotossistemas mostraram um impacto da seca nas plantas de CL153, mas não nas de Icatu, o que concorda com os valores de F_v'/F_m' que desceram em CL153 e se mantiveram em Icatu, sugerindo uma maior tolerância dos fotossistemas em Icatu. Com o aumento de temperatura as plantas Ctl de ambos os génotipos mantiveram (ou aumentaram) as taxas de transporte de elétrons até 37/28 °C, e mesmo a 42/30 °C os impactos foram reduzidos ou inexistentes em relação aos valores iniciais a 25/20 °C. Desta forma, o acréscimo dos impactos observados na A_{max} não será atribuível (pelo menos na sua maior parte) a problemas ao nível da atividade dos fotossistemas. Esta tolerância ao nível dos fotossistemas confirma resultados reportados em café para exposição a temperaturas supra-ótimas (RODRIGUES et al., 2016), ou considerando a rapidez na recuperação após submissão a alta irradiância (RAMALHO et al., 1999) e baixas temperaturas (RAMALHO et al., 2003).

Deve-se igualmente realçar que a exposição simultânea a ambos os estresses mostra impacto a 37/28 °C em ambos os fotossistemas dos genótipos, tendo em conta as diferenças entre plantas Ctl e *SD* nessa temperatura. Contudo, nas plantas *SD* ocorre agravamento moderado quando comparado com a temperatura de 25/20 °C, mostrando alguma interação dos estresses nesta temperatura, que se torna mais evidente a 42/30 °C. Nesta temperatura, as plantas *SD* mostraram decréscimos da atividade dos fotossistemas, com reduções face às plantas Ctl a 25/20 °C que atingem 31% e 13% (*PSII+OEC*), 38% e 12% (*PSII-OEC*) e 31% e 20% (*PSI*), respectivamente em CL153 e Icatu, que terão contribuído para o decréscimo de A_{max} (Tabela 3). Contudo, ao contrário de A_{max} , os impactos nos fotossistemas são menores em Icatu, o que poderá estar ligado a um maior reforço dos mecanismos antioxidativos, como observado na resposta a estresses de calor e frio (RAMALHO et al., 2003; FORTUNATO et al., 2010; RAMALHO et al., 2013; MARTINS et al., 2016). Esta diferença entre genótipos é também observável na prevalência de impactos negativos nos fotossistemas em Rec14 nas plantas CL153-Ctl e *SD* e Icatu-*SD*, em linha com a recuperação incompleta de F_v/F_m nas plantas *SD* (Tabela 4) e com a recuperação total de P_n , A_{max} e F_v'/F_m' nas Icatu-Ctl.

A exposição a estresses pode causar estresse oxidativo, particularmente levando à dissociação do complexo de evolução do oxigênio (*OEC*) do *PSII*, resultando numa maior inibição do transporte de elétrons para o lado do receptor do *PSII* (WANG et al., 2018). Já a fotoinibição de *PSI* é induzida principalmente por *ROS* produzidas no lado receptor do *PSI* através da reação de Mehler (SONOIKE, 2011; YAN et al., 2013). O *PSI* é frequentemente considerado como mais resistente, devido a um mecanismo mais eficiente que o protege da fotoinibição, mediada principalmente por enzimas como a superóxido dismutase e a ascorbato peroxidase que removem espécies reativas de oxigênio (*ROS*) produzidas no lado redutor do *PSI* (OZAKCA, 2013). Entretanto, nossos resultados mostram que a 42/30 °C o *PSI* e *PSII* apresentaram afetação semelhante (tanto nas plantas Ctl, marginalmente afetadas, como nas *SD*) e moderada, tendo em conta a severidade dos estresses (individuais e em simultâneo). Desta forma, os mecanismos de dissipação de energia na forma térmica (ROCHAIX, 2011; NATH et al., 2013; GURURANI et al., 2015), refletidos no nosso trabalho em $Y_{(NPQ)}$ e q_N , assim como a possível presença de pigmentos de fotoproteção e a ação de enzimas antioxidativas (RODRIGUES et al. 2016) terão conferido um nível de proteção que mesmo em condições extremas permitiu a manutenção de atividade considerável de ambos os fotossistemas (Tabelas 4 e 5).

Intimamente associado à variação das taxas de transporte de elétrons estão os transportadores existentes nas membranas dos tilacóides. Algumas diferenças foram

observadas em relação a cada um dos transportadores, relativamente aos estresses e dependente do genótipo. A exposição à seca não teve impacto negativo em Icatu em nenhum dos transportadores, observando-se inclusive reforços significativos das quantidades (exceto Cit b_{563}), particularmente em *PQ-9* (que duplicou), o que está de acordo com a manutenção da sua capacidade de transporte de elétrons no dois fotossistemas.

A *PQ-9* corresponde à forma redox da plastoquinona que possui propriedades antioxidantes, com capacidade de suprimir o oxigênio singlete (1O_2) e inibir a oxidação das membranas lipídicas, também desempenha papel importante na regulação das expressões gênicas. Assim, possivelmente os incrementos observados podem ter ocorrido devido à função de proteção (KSAS et al., 2018). Por outro lado, ainda em relação à exposição apenas a seca severa, nas plantas de CL153-*SD* apenas *PQ-9* não apresentou reduções significativas, enquanto Cit b_{559HP} e Cit b_{563} mostraram reduções de *ca.* 30%, o que poderá estar ligado ao decréscimo observado na atividade dos dois fotossistemas e na eficiência fotoquímica do *PSII* (F_v/F_m) nestas plantas. Sabe-se que o complexo citocromo b_6f é um dos locais predominantes no controle do fluxo fotossintético, e que mudanças na capacidade de transporte de elétrons e assimilação foliar se correlacionam estreitamente com o conteúdo deste complexo, que responde fortemente às mudanças nas condições ambientais e estados metabólicos (SCHÖTTLER e TOTH, 2014; SCHÖTTLER et al., 2015), registando-se diminuições na transferência de elétrons do complexo Cyt b_6f para PSI (SANDA et al., 2011) e do conteúdo do complexo citocromo b_6f (KOHZUMA et al., 2009) em condições de estresse hídrico.

O aumento de temperatura (plantas Ctl) provocou a 42/30 °C pequenas reduções nos transportadores (exceto *PQ-9*) em ambos os genótipos, significativas apenas em CL153 para Cit b_{559LP} (9%), Cit b_{559HP} (10%) e Cit f (14%). Ainda assim, estes resultados refletem uma tolerância considerável em ambos os genótipos ao nível destes componentes da cadeia de transporte de elétrons, sugerindo que os significativos decréscimos na P_n e A_{max} não se devem particularmente ao impacto nas actividades dos fotossistemas ou a alterações no teor dos transportadores tilacóidais de elétrons.

Em linha com os resultados obtidos nas actividades de ambos os fotossistemas, a sobreposição de estresses (plantas *SD*) teve consequências claras a partir de 37/28 °C, por comparação ao valor observado a 25/20 °C e às plantas Ctl nessa temperatura, embora sem diferenças óbvias entre genótipos.

No final do período de recuperação registraram-se valores próximos às plantas Ctl no início do experimento para plantas Ctl e *SD* apenas em *PQ-9* para ambos os genótipos. No restantes transportadores as plantas Icatu-Ctl recuperaram em todos excepto Cit b_{563} , enquanto

as Icatu-*SD* mostraram afetação em todos eles. Já as plantas CL153-Ctl e *SD* não recuperam em nenhum dos citocromos, com melhor recuperação nas últimas (em linha com a atividade dos dois fotossistemas), embora confirmando o maior impacto do calor nas plantas CL153 do que nas Icatu.

Atividade de Enzimas da Fotossíntese

Para além da parte fotoquímica (analisada acima), os impactos nos processos bioquímicos envolvidos no Ciclo de Calvin-Benson são de extrema importância na tolerância fotossintética aos estresses ambientais. De fato, os impactos na atividade da RuBisCO têm sido considerados críticos e os mais importantes relativamente ao impacto de temperaturas elevadas (RODRIGUES et al., 2016), ou à aclimação a alta irradiância (RAMALHO et al., 1999) e frio (RAMALHO et al., 2003) em *Coffea* spp. Estima-se que a diminuição da atividade de RuBisCO será um dos principais efeitos induzidos pelas mudanças climáticas, pelo que deverá ser considerada em qualquer modelo de previsão sobre a produtividade das plantas no futuro (GALMÉS et al., 2013). Contudo, deve-se também ter em conta que no caso concreto do cafeeiro (mas também noutras culturas) o aumento de CO₂ atmosférico ligado ao aquecimento global pode ter um impacto positivo ao nível da carboxilação (diretamente pelo aumento de CO₂ e indirectamente pelo aumento de competição do CO₂ com o O₂ reduzindo a fotorrespiração), melhorando o crescimento das plantas e a sua capacidade de tolerar estresses ambientais, como as temperaturas supra-ótimas (MARTINS et al., 2014; 2016; RODRIGUES et al., 2016; DAMATTA et al., 2018; 2019).

Os valores de ativação em Icatu são semelhantes aos encontrados anteriormente a 25/20 °C (RAMALHO et al., 2003). Como vimos atrás, o déficit hídrico imposto promoveu um impacto nas atividades da RuBisCO (inicial e total), de forma mais clara em CL153, mas não afetou a Ru5PK. Adicionalmente, a temperatura não provocou impactos negativos (Ctl) nem mostrou interação com a seca (*SD*) até 37/28 °C, havendo pelo contrário aumentos das atividades enzimáticas avaliadas (nas plantas Ctl). Apenas a 42/30 °C há impactos significativos da temperatura *per se* (Ctl), e uma forte interação dos dois estresses, em ambos os génotipos e enzimas, que mostram decréscimos de mais de 70% dos valores das suas atividades (Tabela 7). Estas reduções confirmam os impactos observados por Rodrigues et al. (2016) para temperaturas de 42/34 °C, e ocorrem apesar do significativo aumento de transcriptos para a RuBisCO (MARTINS et al., 2017). Desta forma, decréscimo de atividade total da RuBisCO poderá ter a ver com uma maior degradação que não é compensada ao nível da tradução (e síntese *de novo*) de novas moléculas de RuBisCO, ou ainda por haver

problemas na conformação ativa da enzima.

O decréscimo de atividade poderá também ter sido causado pela inativação da enzima, através do bloqueio de uma percentagem dos sítios catalíticos de RuBisCO devido à ligação de inibidores produzidos em condições estressantes que diminuem a concentração de locais cataliticamente disponíveis para carboxilação (GALMÉS et al., 2013; DALAL e TRIPATHY, 2018). De fato, a diminuição na atividade de RuBisCO está associada à regulação negativa do estado de ativação da enzima em resposta à seca ou/e à alta temperatura (GALMÉS et al., 2013). Contudo, as altas temperaturas prejudicam a ativação do RuBisCO pela ação sobre a chaperona catalítica, a RuBisCO activase (Rca), que é extremamente sensível ao calor, tornando-se a principal causa da diminuição da fotossíntese (GALMÉS et al., 2013; SHIVHARE e MUELLER-CAJAR, 2017; PERDOMO et al., 2017). Contudo, tal não parece ser o caso em *Coffea* spp. em relação a ambos os estresses pois o estado de ativação foi apenas alterado em CL153 em relação à seca (recuperando já a 31/25 °C ainda nas plantas SD) e não mostrou alterações a 42/30 °C em relação ao observado a 25/20 °C (com ou sem seca).

Adicionalmente, em condições de calor e estresse hídrico pode haver a estimulação da oxigenação em relação à carboxilação, promovendo a função de oxigenação da RuBisCO que desta forma aumentará a taxa de fotorespiração e a produção de H₂O₂, uma molécula tóxica para as células vegetais (SONG et al., 2014). Apesar do efeito de maior taxa de oxigenação devido à restrição de acesso de CO₂ aos locais de carboxilação (devido ao fecho estomático) poder justificar o impacto na P_n , seria ultrapassado na determinação da atividade total da RuBisCO durante a qual a amostra é incubada com alta disponibilidade de CO₂. Desta forma, os decréscimos de atividade total estarão em *Coffea* spp. provavelmente relacionados com modificações da conformação nativa/funcional da proteína e/ou degradação da mesma nas condições de alta temperatura, contrastando com significativa tolerância que esta enzima mostrou noutras espécies (BERRY e BJÖRKMAN, 1980; WISE et al., 2004).

Relativamente à enzima Ru5PK, a diminuição da sua atividade já a 37/28 °C (SD) e a 42/30 °C (Ctl e SD) poderá estar relacionada com a baixa disponibilidade de RuBP, tendo em conta a redução de P_n (e de g_s), reforçando a hipótese de que a forte redução P_n pode incluir disponibilidade limitada de substrato para o ciclo de Calvin (PARTELLI et al., 2009). No final do período de recuperação ambas as enzimas mostram valores semelhantes aos do controle inicial (exceto em Ru5PK nas plantas em C1153 Ctl), mostrando uma boa capacidade de recuperação tal como observado após submissão de *C. arabica* cv. Catucaí IPR102 a 4° C (PARTELLI et al., 2009). É ainda relevante notar que esta recuperação das atividades

enzimáticas foi acompanhada da recuperação de A_{max} e, especialmente em Icatu, de P_n , mesmo tendo ainda permanecido alguns impactos em diversos parâmetros fotoquímicos (por exemplo $Y_{(II)}$, q_L , F_v/F_m' , alguns transportadores como os Cit f e b_{563} , e taxas de transporte de elétrons (estas em CL153), o que parece reforçar a noção da importância da sensibilidade/tolerância da parte bioquímica na sensibilidade/tolerância global da via fotossintética em *Coffea* spp.

Assim, as reações bioquímicas parecem constituir o ponto principal da afetação do metabolismo fotossintético (e de A_{max} enquanto valor integrador de todos os processos), tendo em conta: 1) a sensibilidade observada nestas enzimas quer nas plantas *SD* desde 25/20 °C até 42/30 °C (principalmente nesta temperatura sob efeito dos dois estresses), quer nas plantas *Ctl* a 42/30 °C, que contrastaram com 2) a muito menor extensão dos impactos ao nível das membranas e funcionamento fotoquímico (parâmetros de fluorescência, transportadores e taxas de transporte de elétrons), reveladoras de uma importante tolerância à seca e ao calor (em especial em Icatu). De fato, a atividade da RuBisCO e as taxas fotossintéticas estão correlacionadas (KUMAR et al., 2016).

Permeabilidade Membranar

A avaliação do aumento da permeabilidade membranar, correspondente à perda de íons, tem sido adotada como uma medida da estabilidade e integridade da membrana celular e como um teste para tolerância a condições estressantes (SCOTTI-CAMPOS et al., 2016; ELBASYONI et al., 2017), nomeadamente ao calor noutras espécies (DIAS et al., 2010), e ao frio em cafeeiros (CAMPOS et al., 2003). Contudo deve ter-se em conta que a perda de eletrólitos pode ser influenciada pela idade planta/tecido, órgão amostral, estágio de desenvolvimento, estação de crescimento, grau de tolerância e espécies de plantas (AL-JEBORY, 2013).

A permeabilidade das membranas (Tabela 8) aumentou de forma moderada devido à exposição a seca severa (mais em CL153 que em Icatu), tal como observado em *C. arabica* exposto à diminuição da disponibilidade hídrica do solo (PELOSO et al., 2017). Notavelmente, as membranas não mostraram sensibilidade térmica (plantas *Ctl*), mantendo o valor de perda de eletrólitos em ambos os genótipos, mesmo a 42/30 °C. Tal está de acordo com as observações discutidas para as taxas de transporte (Table 5) e transportadores (Tabela 6) de elétrons, que são dependentes da manutenção da integridade das membranas do cloroplasto. Estes resultados concordam ainda com observações de que a permeabilidade membranar permaneceu estável entre as estações de Primavera (temperatura amena) e Verão

(alta temperatura), sem diferenças entre os genótipos *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62 e *C. canephora* cv. Conilon Emcapa 8111 Clone 02 (RODRIGUES et al., 2018), o que pode estar associado a remodelações ao nível da matriz lipídica das membranas, por forma a tornar mais rígida (por exemplo, aumentando a saturação dos ácidos graxos) uma membrana que o aumento de temperatura torna mais fluida (PARTELLI et al., 2011; SCOTTI-CAMPOS et al., 2014). Neste estudo as plantas foram submetidas a temperaturas máxima e média em torno dos 32 e 26 °C na Primavera e 38 e 31 °C no Verão, respectivamente, claramente dentro (e abaixo) da gama de valores estudada nos nossos genótipos. Estão também de acordo com a termotolerância da maquinaria fotossintética até uma gama de valores de 37 a 40 °C, ao nível do funcionamento do PSII e dos tilacoides, como reflete a manutenção dos valores de F_v/F_m , taxas de transporte de eletróns e perda de eletrólitos pelas membranas em *Coffea* spp. (MARIAS et al. 2017).

Contudo, contrastando com as plantas Icatu-SD, observou-se um forte aumento da perda de eletrólitos a 42/30 °C nas plantas CL153-SD, o que evidencia uma interação de ambos os estresses apenas neste genótipo. Tal terá estado associado ao impacto no transporte de eletróns associado aos *PSII* e *PSI*, com quebras sempre acima de 30% (Tabela 5). De fato, os estresses ambientais prejudicam a atividade da membrana tilacóide pela sua ruptura, inibindo assim as atividades dos transportadores de eletróns e enzimas associados à membrana, resultando na redução da taxa de *PSI* e *PSII* e da fotossíntese (PINHEIROS e CHAVES, 2011; NOURI et al., 2015). O agravamento da perda de eletrólitos pelo efeito combinado de seca e temperatura elevada foi também reportado em beldroega, por comparação ao controle e estresses individuais (JIN et al., 2016).

Os estresses ambientais são conhecidos por promover modificações da composição lipídica das membranas, pois a natureza dos ácidos graxos que compõem as membranas lipídicas das plantas pode variar com as condições de temperatura e disponibilidade hídrica (MARTINS et al., 2008). Contudo, deve-se notar que a limitação do uso de energia pelos processos fotoquímicos pode aumentar a produção de ROS (LOGAN, 2005), que podem causar lesões nas membranas (KONG et al., 2016), nomeadamente por lipoperoxidação (PARTELLI et al., 2011; AL-JEBORY, 2013; SCOTTI-CAMPOS et al., 2014), contribuindo assim para o aumento da perda de eletrólitos (WAHID et al. 2007; DIAS et al. 2010).

Finalmente, observou-se que no período de recuperação as plantas SD de ambos os genótipos mantiveram valores algo acima dos valores de controle iniciais, concordando com a recuperação parcial observada em diversos parâmetros (por exemplo, F_v/F_m , F_s/F_m' , Taxas de transporte de eletróns, Cit b_{559HP} , Cit b_{559LP} , Cit f e Cit b_{563}), conforme discutido acima para a

relação entre a integridade membranar e os eventos ligados às membranas.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo fornecem evidências importantes dos impactos individuais e conjuntos do calor e seca sobre o funcionamento da maquinaria fotossintético e seus pontos mais relevantes de tolerância/sensibilidade, em dois genótipos de cafeeiros representando as duas espécies mais cultivadas.

È normalmente aceito que a espécie *C. canephora* apresenta um maior grau de tolerância a estresses ambientais do que a espécie *C. arábica*, entretanto vimos um bom desempenho do mesmo e por hora nalgumas vezes até melhor do que o Conilon em pontuais situações e parâmetros avaliados.

Notou-se que as plantas bem regadas mantiveram bom desempenho fotossintético com aumento de temperatura, apresentando alterações somente a 39/30 °C em CL153 e Icatu a partir de 34/28 °C assim como houve aumento de F_o e diminuição em F_v/F_m e aumento no nível de fotoinibição do PSII. Apesar de, por exemplo, P_n , g_s , E , $Y_{(II)}$ e A_{max} mostrarem impactos da seca severa, diversos parâmetros fotossintéticos não mostram impacto relevante relacionados com funcionamento da maquinaria fotossintética nas plantas de ambos os genótipos quando expostas a condições de seca severa (e.g., taxas de transporte de elétrons) ou para temperaturas até 37/20 °C ou 39/30 °C (e.g., F_o , F_v/F_m , atividades da RuBisCO), ocorrendo até melhor comportamento nas plantas de Icatu (por exemplo funcionamento dos *PSII* e *PSI*). Desta forma, nestas condições muito do que se observa terá provavelmente mais a ver com processos de regulação e fotoproteção do que com danos permanentes.

De modo geral, a 42/30 °C houve sinais evidentes de efeitos negativos da temperatura (com ou sem a sobreposição de condições de seca, com impacto particularmente extenso na atividade da RuBisCO e da Ru5PK, mas com um impacto generalizado no caso da sobreposição de estresses como decréscimos do teor de *PQ-9*, da taxa de transporte de elétrons (no *PSII* e *PSI*) e perda de electrólitos (CL153). Deve notar-se que nem sempre a exposição simultânea aos dois estresses piorou a resposta das plantas *SD*, como é exemplo o caso dos transportadores tilacoidais de elétrons (exceto *PQ-9*), muitas vezes houve a manutenção mesmo em condição de seca e aumento de temperatura.

Notável capacidade de recuperação foi vista após reestabelecimento das condições normais de água e temperatura para maioria dos parâmetros, de forma mais evidente as trocas gasosas, sendo que A_{max} foi totalmente recuperado logo nos primeiros dias de recuperação. Alguns parâmetros da fluorescência da clorofila e alguns transportadores apresentaram boa

recuperação, outros nem tanto dependendo da espécie e das condições estressantes. Os fotossistemas e transportadores foram mais impactados, mostrando pior recuperação. Estes foram protegidos por aumentos dos fotoprotetores $Y_{(NPQ)}$ e qN que foram suficientes para impedir a fotoinativação refletida pela manutenção de $Y_{(NO)}$.

Logo, há demonstração da capacidade de resiliência do cafeeiro frente às condições ambientais estressantes. Nesse sentido, as perspectivas futuras sobre a sustentabilidade da produção de café, são baseadas apenas em cenários de temperatura crescentes, não deverão ser tão catastróficas como previsto anteriormente se maiores esforços em estudos neste sentido forem firmados entre a cadeia científica.

AGRADECIMENTOS

Os trabalhos deste capítulo contaram com o apoio financeiro da União Europeia, através do Projeto BreedCAFS (proposta 727934), Programa Horizonte 2020, Edital, H2020-SFS-2016-2, Ação RIA, assim como de fundos nacionais da Fundação para a Ciência e a Tecnologia através das Unidades de Investigação UID/AGR/04129/ 2013 (LEAF) e UID/GEO/04035/2013 (GeoBioTec).

Bolsas da CAPES (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) Processo nº: 88881.132375/2016-01, Danielly Duberstein) e do CNPq, atribuídas a Fábio L. Partelli e Fábio M. DaMatta são também altamente reconhecidas.

REFERÊNCIAS

- AL-JEBORY, E.I. Changes in cellular membrane tolerance due to heat stress during *Triticum sativum* L. seeds germination. *Magazin of Alkufa University for Biology*, v. 5, n. 2, 2013. URL: <http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index>.
- ASSAD, E.D.; PINTO, H.S.; ZULLO J.J.; ÁVILA, A.M.H. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, p. 1057-1064, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004001100001>.
- BACA, M.; LADERACH, P.; HAGGAR, J.; SCHROTH, G.; OVALLE, O. An Integrated Framework for Assessing Vulnerability to Climate Change and Developing Adaptation Strategies for Coffee Growing Families in Mesoamerica. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2014: e88463. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088463>.
- BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 403, p. 1607-1621, 2004: DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erh196>.
- BALIZA, D.P.; CUNHA, R.L.; CASTRO, E.M.; BARBOSA, J.P.R.A.D.; PIRES, M.F.; GOMES, R.A. Trocas gasosas e características estruturais adaptativas de cafeeiros cultivados em diferentes níveis de radiação. *Coffee Science*, v. 7, n. 3, p. 250-258, 2012. DOI:

<http://dx.doi.org/10.25186/cs.v7i3.347>.

BARNABAS, B.; JAGER, K.; FEHER, A. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell. Environmental*, v. 31, p. 11-38, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x>.

BATISTA, L.A.; GUIMARÃES, R.J.; PEREIRA, F.J.; CARVALHO, G.R.; CASTRO, E.M. de. Anatomia foliar e potencial hídrico na tolerância de cultivares de café ao estresse hídrico. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, p. 475-481, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902010000300022>.

BATISTA-SANTOS, P.; LIDON, F.C.; FORTUNATO, A.; LEITÃO, A.E.; LOPES, E.; PARTELLI, F.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. The Impact of Cold on Photosynthesis in Genotypes of *Coffea* spp. Photosystem Sensitivity, Photoprotective Mechanisms and Gene Expression. *Journal of Plant Physiology*, v. 168: p. 792-806, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.013>.

BEACH, R.H.; CAI, Y.; THOMSON, A.; ZHANG, X.; JONES, R.; MCCARL, B.A.; CRIMMINS, A.; MARTINICH, J.; COLE, J.; OHREL, S.; DEANGELO, B.; MCFARLAND, J.; STRZEPEK, K.; BOEHLERT B. Climate change impacts on us agriculture and forestry: benefits of global climate stabilization. *Environmental Research Letters*, v. 10, 095004, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/1748-9326/10/9/095004>.

BERRY, J.; BJÖRKMAN, O. Photosynthetic Response and Adaptation to Temperature in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 31, p. 491-543, 1980. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.31.060180.002423>.

BERTRAND, B.; BOULANGER, R.; DUSSERT, S.; RIBEYRE, F.; BERTHIOT, L.; DESCROIX, F.; JOËT, T. Climatic Factors Directly Impact The Volatile Organic Compound Fingerprint in Green Arabica Coffee Bean as Well as Coffee Beverage Quality. *Food Chemistry*, v. 135, p. 2575-2583, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.060>.

BRUM, C. N.; MELO, F. E. Modifications in the metabolism of carbohydrates in (*Coffea arabica* L. cv. Siriema) seedlings under drought conditions. *Coffee science, Lavras*, v. 8, p. 140-147, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v8i2.384>.

BUNN, C.; LÄDERACH, P.; RIVERA, O.O.; KIRSCHKE, D. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Climatic Change*, v. 129, p. 89-101, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10584-014-1306-x>.

BUSCH, F.; HUNTER, N.P.A.; ENSMINGER, I. Biochemical constrains limit the potential of the photochemical reflectance index as a predictor of effective quantum efficiency of photosynthesis during the winter-spring transition in Jack pine seedlings. *Functional Plant Biology*, v. 36, p. 1016-1026, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1071/FP08043>.

CAMPOS, P.S.; QUARTIN, V.; RAMALHO, J.C.; NUNES, M.A. Electrolyte Leakage and Lipid Degradation Account for Cold Sensitivity in Leaves of *Coffea* sp. *Plants. Journal of Plant Physiology*, v. 160, p. 283-292, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-00833>.

CAVATTE P.C.; OLIVEIRA A.A.G., MORAIS L.E.; MARTINS S.C.V.; SANGLARD L.M.V.P.; DAMATTA F.M. Could Shading Reduce the Negative Impacts of Drought on Coffee? A Morphophysiological Analysis. *Physiologia Plantarum*, v. 144, p. 111-122, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01525.x>

CAZZANIGA, S.; DALL'OSTO, L.; KONG, S.G.; WADA, M.; BASSI, R. BassiInteraction

between avoidance of photon absorption, excess energy dissipation and zeaxanthin synthesis against photooxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, v. 76, n. 4, p. 568-579, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12314>.

CHAVES, A.R.M.; TEN-CATEN, A.; PINHEIRO, H.A.; RIBEIRO, A.; DAMATTA, F.M. Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. *Trees*, v. 22, p. 351-361, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00468-007-0190-7>.

CRAFTS-BRANDNER, S. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *PNAS*, v. 97, n. 24, 13430-13435, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.230451497>.

CRAPARO, A.C.W.; VAN ASTEN, P.J.A.; LÄDERACH, P.; JASSOGNE, L.T.P.; GRAB, S.W. *Coffea arabica* yields decline in Tanzania due to climate change: Global implications. *Agricultural And Forest Meteorology*, v. 207, p. 1-10, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2015.03.005>.

DALAL, V.K.; TRIPATHY, B.C. Water-stress induced downsizing of light-harvesting antenna complex protects developing rice seedlings from photo-oxidative damage. *Scientific RePorTs*, v. 8, p. 5955, 2018: DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14419-4>.

DaMATTA, F. M. Coffee tree growth and environmental acclimation. Chapter taken from: Lashermes, P. (ed.), *Achieving sustainable cultivation of coffee*, Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, 2018 (ISBN: 978 1 78676 152 1; www.bdspublishing.com). DOI: <http://dx.doi.org/10.19103/AS.2017.0022.02>.

DaMATTA, F.M.; AVILA, R.T.; CARDOSO, A.A.; MARTINS, S.C.V.; RAMALHO, J.C. Physiological and Agronomic Performance of the Coffee Crop in the Context of Climate Change and Global Warming: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, p. 5264-5274, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04537>.

DaMATTA, F.M.; GODOY, A.G.; MENEZES-SILVA, P.E.; MARTINS, S.C.V.; SANGLARD, L.M.V.P.; MORAIS, L.E.; TORRE-NETO, A.; GHINI, R. Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of Experimental Botany*, v. 67, p. 341-352, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erv463>.

DaMATTA, F.M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, B.C.; BUCKERIGDE, M.S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International*, v. 43, p. 1414-1423, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.11.001>.

DaMATTA, F.M.; RAHN, E.; LÄDERACH, P.; GHINI, R.; RAMALHO, J.C. Why Could the Coffee Crop Endure Climate Change and Global Warming to a Greater Extent Than Previously Estimated? *Climatic Change*, 12p, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10584-018-2346-4>.

DaMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, p. 55-81, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202006000100006>.

DAVIS, A.P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M.F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean*

- Society, v. 167, p. 357-377, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>.
- DIAS, A.S.; BARREIRO, M.G.; CAMPOS, P.S.; RAMALHO, J.C.; LIDON, F.C. Wheat cellular membrane thermotolerance under heat stress. *Journal Agronomy of Crop Science*, v. 196, p. 100-108, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-037X.2009.00398.x>.
- DUBBERSTEIN, D.; PARTELLI, F.L.; DIAS, J.R.M.; ESPINDULA, M.C. Influence of fertilization on coffee trees vegetative growth in west south Amazon. *Coffee Science*, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v12i2.1228>.
- DUBBERSTEIN, D.; RODRIGUES, W.P.; SEMEDO, J.N.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; REBOREDO, F.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LIDON, F.C.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; DaMATTa, F.M.; RAMALHO, J.C. Mitigation of the Negative Impact of Warming on the Coffee Crop: The Role of Increased Air [CO₂] and Management Strategies. In: Shanker, A. (Edi). *Climate Resilient Agriculture, Strategies and Perspectives*. Londres: IntechOpen, 2018. cap.4, p. 57-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72374>.
- ELBASYONI, I.; SAADALLA, M.; BAENZIGER, S.; BOCKELMAN, H.; MORSY, S. Cell Membrane Stability and Association Mapping for Drought and Heat Tolerance in a Worldwide Wheat Collection. *Sustainability*, n. 9, p. 1606, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/su9091606>.
- FORTUNATO, A.; LIDON, F.C.; BATISTA-SANTOS, P.; LEITÃO, A.E.; PAIS, I.P.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. Biochemical and Molecular Characterization of the Antioxidative System of *Coffea* sp. Under Cold Conditions in Genotypes with Contrasting Tolerance. *Journal of Plant Physiology*, v. 167, p. 333-342, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.10.013>.
- FRANKS, P.J.; BEERLING, D.J. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, p. 10343-10347, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0904209106>.
- GALMÉS, J., ARANJUELO, I., MEDRANO, H., AND FLEXAS, J. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosynthesis Research*, v. 117, p. 73-90. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-013-9861-y>.
- GAMA, T.C.P.; SALES JUNIOR, J.C.; CASTANHEIRA, D.T.; SILVIERA, H.R.O.; AZEVEDO, H.P.A. Anatomia foliar, fisiologia e produtividade de cafeeiros em diferentes níveis de adubação. *Coffee Science*, v. 12, n. 1, p. 42-48, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v12i1.1195>.
- GAY, C.; ESTRADA, F.; CONDE, C.; EAKIN, H.; VILLERS, L. Potential impacts of climate change on agriculture: a case of study of coffee production in Veracruz, Mexico. *Climatic Change*, v. 79, p. 259-288, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10584-006-9066-x>.
- GONZALEZ-MORENO, S.; PERALES VEJA, H.; SALCEDO ALVAREZ, M.O. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educação Bioquímica*, v. 27, n. 4, p. 119-1129, 2008.
- GRISI, F.A.; ALVES, J.D.; CASTRO, E.M.; OLIVEIRA, C.; BIAGIOTTI, G.; MELO, L.A. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café ‘Catuaí’ e ‘Siriema’ submetidas ao estresse

- hídrico. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000600008>.
- GURURANI, M.A.; VENKATESH, J.; TRAN, L.S.P. Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress Induced Photoinhibition. *Molecular Plant*, v. 8, n. 9, p. 1304-1320, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>.
- HALDIMANN, P.; FELLER, U. Inhibition of Photosynthesis by High Temperature in Oak (*Quercus pubescens* L.) Leaves Grown under Natural Conditions Closely Correlates with a Reversible Heat-Dependent Reduction of the Activation State of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant, Cell & Environment*, v. 27, p. 1169-1183, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01222.x>.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ALAM, M.M.; ROYCHOWDHURY, R.; FUJITA, M. Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Science*, v. 14, n. 5, p. 9643-84. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14059643>.
- HAWORTH, M.; COSENTINO, S.L.; MARINO, G.; BRUNETTI, C.; RIGGI, E.; AVOLA, G.; LORETO, F.; CENTRITTO, M. Increased free abscisic acid during drought enhances stomatal sensitivity and modifies stomatal behaviour in fast growing giant reed (*Arundo donax* L.). *Environmental and Experimental Botany*, v. 147, p. 116-124, 2018a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.11.002>
- HAWORTH, M.; MARINO, G.; BRUNETTI, C.; KILLI, D.; DE CARLO, A.; CENTRITTO, M. The Impact of Heat Stress and Water Deficit on the Photosynthetic and Stomatal Physiology of Olive (*Olea europaea* L.) A Case Study of the 2017 Heat Wave. *Plants*, v. 7, n. 4, p. 76, 2018b. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants7040076>
- HUANG, W.; ZHANG, S-B.; CAO, K-F. Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection of tropical trees illuminated at temporal chilling temperature. *Plant Cell Physiology*, v. 52, p. 297-305, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcq166>.
- IPCC. Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [EDENHOFER, O.; PICHES-MADRUGA, R.; SOKONA, Y.; FARAHANI, E.; KADNER, S.; SEYBOTH, K.; ADLER, A.; BAUM, I.; BRUNNER, S.; EICKEMEIER, P.; KRIEMANN, B.; SAVOLAINEN, J.; SCHLÖMER, S.; VON STECHOW, C.; ZWICKEL, T.; MINX J.C. (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 2014.
- JIANG, Y.; XU, Z.; ZHOU, G.; LIU, T. Elevated CO₂ can modify the response to a water status gradient in a steppe grass: from cell organelles to photosynthetic capacity to plant growth. *BMC Plant Biology*, v. 16, p. 157, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-016-0846-9>.
- JIN, R.; WANG, Y.; LIU, R.; GOU, J.; CHAN, Z. Physiological and Metabolic Changes of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) in Response to Drought, Heat, and Combined Stresses. *Frontier Plant Science*, v. 6, p. 1123, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.01123>.
- JOËT, T.; LAFFARGUE, A.; DESCROIX, F.; DOULBEAU, S.; BERTRAND, B.; KOCHKO, A.; DUSSERT, S. Influence of Environmental Factors, Wet Processing and Their Interactions on The Biochemical Composition of Green Arabica Coffee Beans. *Food Chemistry*, v. 118, p. 693-701, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.048>.

- KIRSCHBAUM, M.U.F. Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies. *Plant Physiology*, v. 155, p. 117-124, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.166819>.
- KLUGHAMMER, C.; SCHREIBER, U. Complementary PSII quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes*, v. 1, p. 27-35, 2008.
- KOHZUMA, K.; CRUZ, J.A.; AKASHI, K.; HOSHIYASU, S.; MUNEKAGE, Y.N.; YOKOTA, A.; KRAMER, D.M. The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought. *Plant, Cell & Environment*, v. 32, n. 3, 2009, p. 209-219. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01912.x>.
- KONG, X.; ZHOU, S.; YIN, S.; ZHAO, Z.; HAN, Y.; WANG, W. Stress-Inducible Expression of an F-box Gene TaFBA1 from Wheat Enhanced the Drought Tolerance in Transgenic Tobacco Plants without Impacting Growth and Development. *Frontier Plant Science*, v. 7, p. 1295, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01295>.
- KONRAD, M.L.F.; SILVA, J.A.B.; FURLANI, P.R.; MACHADO, E.C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. *Bragantia*, v. 64, n. 3, p. 339-347, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052005000300004>.
- KRAMER, D.M.; JOHNSON, G.; KIIRATS, O.; EDWARDS, G.E. New flux parameters for the determination of QA redox state and excitation fluxes. *Photosynthesis Research*, v. 79, p. 209-218, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d>.
- KRAUSE, G.H.; JAHNS, P. Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In: *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (eds. Papageorgiou G.C., Govindjee), p. 463-495, 2004. Springer, Dordrecht, The Netherlands. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_18.
- KSAS, B.; LÉGERET, B.; FERRETTI, U.; CHEVALIER, A.; POSPISIL, P.; ALRIC, J.; HAVAUX, M. The plastoquinone pool outside the thylakoid membrane serves in plant photoprotection as a reservoir of singlet oxygen scavengers. *Plant Cell Environment*, v. 41, p. 2277-2287, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/pce.13202>.
- KUMAR, R.R.; GOSWAMI, S.; SINGH, K.; DUBEY, K.; SINGH, S.; SHARMA, R.; VERMA N.; KALA Y.K.; RAI G.K.; GROVER, M.; MISHRA, D.C.; SINGH, B.; PATHAK, H.; CHINNUSAMY, V.; RAI, A.; Praveen, S. Identification of Putative RuBisCo Activase (TaRca1) - The Catalytic Chaperone Regulating Carbon Assimilatory Pathway in Wheat (*Triticum aestivum*) under the Heat Stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00986>.
- LAMBERS, H.; CHAPIN III, F.S., PONS, T.L. *Plant Physiological Ecology*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag; 2008. 604 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-78341-3>.
- LOGAN, B.A. Reactive Oxygen Species and Photosynthesis. In: Smirnoff N, editor. *Antioxidants and Reactive Oxygen in Plants*. Oxford: Blackwell Publishing; p. 250-267, 2005.
- MARIAS, D.E.; MEINZER, F.C.; STILL, C. Impacts of leaf age and heat stress duration on photosynthetic gas exchange and foliar nonstructural carbohydrates in *Coffea arabica*. *Ecology and Evolution*, v. 7, p. 1297-1310, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.2681>
- MARTINS, L.D.; EUGENIO, F.C.; RODRIGUES, W.N.; BRINATI, S.V.B.; COLODETTI,

- T.V.; CHRISTO, B.F.; OLIVAS, D.B.L.; PARTELLI, F.L.; DO AMARAL, J.F.T.; TOMAZ, M.A.; RAMALHO, J.D.C.; DOS SANTOS, A.R. Adaptation to Long-Term Rainfall Variability for Robusta Coffee Cultivation in Brazilian Southeast. *American Journal of Climate Change*, v. 7, p. 487-504, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajcc.2018.74030>
- MARTINS, L.D.; TOMAZ, M.A.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Combined Effects of Elevated [CO₂] and High Temperature on Leaf Mineral Balance in *Coffea* spp. *Plants. Climatic Change*, v. 126 (3-4), p. 365-379, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10584-014-1236-7>.
- MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.F.; RODRIGUES, W.P.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; LIDON, F.C.; DaMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C.; RIBEIRO-BARROS, A.I. Selection and Validation of Reference Genes for Accurate RT-qPCR Data Normalization in *Coffea* spp. Under a Climate Changes Context of Interacting Elevated [CO₂] and Temperature. *Frontiers in Plant Science*, v. 8: art 307, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.00307>.
- MARTINS, M.Q.; RODRIGUES, W.P.; FORTUNATO, A.S.; LEITÃO, A.E.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SILVA, M.J.; REBOREDO, F.H.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.J.C.; DaMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Protective Response Mechanisms to Heat Stress in Interaction with High [CO₂] Conditions in *Coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*, v. 29, p. 947-964, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00947>.
- MATOS, M.C., CAMPOS, P.S., RAMALHO, J.C., MEDEIRA, M.C., MALA, M.I., SEMEDO, J.M., MARQUES, N.M., MATOS, A. Photosynthetic activity and cellular integrity of the Andean legume *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi under heat and water stress. *Photosynthetica*, v. 40, n. 4, p. 493-501, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1024331414564>
- MELO, E.F.; FERNANDES-BRUM, C.N.; PEREIRA, F. J.; CASTRO, E.M.; CHALFUN-JÚNIOR, A. Anatomic and physiological modifications in seedlings of *Coffea arabica* cultivar Siriema under drought conditions. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 38, n. 1, p. 25-33, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000100003>.
- MENEZES-SILVA, P.E.; SANGLARD, L.M.P.V.; ÁVILA, R.T.; MORAIS, L.E.; MARTINS, S.C.V.; NOBRES, P.; PATREZE, C.M.; FERREIRA, M.A.; ARAÚJO, W.L.; FERNIE, A.R.; DAMATTA, F.M. Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. *Journal of Experimental Botany*, v. 68, p. 4309-4322, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erx211>.
- MISHRA, K.B.; MISHRA, A.; NOVOTNÁ, K.; RAPANTOVÁ, B.; HODAŇOVÁ, P.; URBAN, O.; KLEM, K. Chlorophyll *a* fluorescence, under half of the adaptive growth-irradiance, for high-throughput sensing of leaf-water deficit in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Methods*, v. 12, n. 46. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13007-016-0145-3>.
- MURCHIE, E.H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 13, p. 3983-3998, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert208>.
- NATH, K.; JAJOO, A.; POUDYAL, R.S.; TIMILSINA, R.; PARK, Y.S.; ARO, E-M.; NAM, H.G.; LEE, C-H. Towards a critical understanding of the photosystem II repair mechanism

- and its regulation during stress conditions. *FEBS Letters*, v. 587, n. 21, p. 3372-3381, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.015>.
- NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C.H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology*, v. 164, p. 1636-1648, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.233478>.
- NOURI, M.Z.; MOUMENI, A.; KOMATSU, S. Abiotic Stresses: Insight into Gene Regulation and Protein Expression in Photosynthetic Pathways of Plants. *International Journal of Molecular Science*, v. 16, n. 9, p. 20392-416, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160920392>.
- NUNES M.A., RAMALHO J.C., DIAS M.A. Effect of Nitrogen Supply on the Photosynthetic Performance of Leaves from Coffee Plants Exposed to Bright Light. *Journal of Experimental Botany*, v. 44, n. 262, p. 893-899, 1993. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/44.5.893>.
- OLVERA-GONZÁLEZ, E.; ALANIZ-LUMBRERAS, D.; IVANOV-TSONCHEV, R.; VILLA-HERNÁNDEZ, J.; ROSA-VARGAS, I.D.L.; LÓPEZ-CRUZ, I.; SILOS-ESPINO, H.; LARA-HERRERA, A. Chlorophyll fluorescence emission of tomato plants as a response to pulsed light based LEDs. *Plant Growth Regul*, v. 69, n. 2, p. 117-123, 2013 DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9753-8>.
- OSÓRIO, M.L.; BREIA, E.; RODRIGUES, A.; OSÓRIO, J.; ROUX, X.L.; DAUDET, F.A.; FERREIRA, I.; CHAVES, M.M. Limitations to Carbon Assimilation by Mild Drought in Nectarine Trees Growing Under Field Conditions. *Environmental and Experimental Botany*, v. 55, p. 235-247, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.11.003>.
- OVALLE-RIVERA, O.; LÄDERACH, P.; BUNN, C.; OBERSTEINER, M.; SCHROTH, G. Projected shifts in *Coffea arabica* suitability among major global producing regions due to climate change. *PLoS ONE*, v. 10, e0124155, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124155>.
- OZAKCA, D.U. Effect of Abiotic Stress on Photosystem I-Related Gene Transcription in Photosynthetic Organisms. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/55350>.
- PARTELLI, F.L.; BATISTA-SANTOS, P.; CAMPOS, P.S.; PAIS, I.P.; QUARTIN, V.L.; VIEIRA, H.D.; RAMALHO, J.C. Characterization of the Main Lipid Components of Chloroplast Membranes and Cold Induced Changes in *Coffea* sp. *Environmental and Experimental Botany*, v. 74, p. 194-204, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.06.001>.
- PARTELLI, F.L.; MARRÉ, W.B.; FALQUETO, A.R.; VIEIRA, H.D.; CAVATTI, P.C. Seasonal vegetative growth in genotypes of *Coffea canephora*, as related to climatic factors. *Journal of Agricultural Science*, v. 5, p. 108-116, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v5n8p108>.
- PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; VIANA, A.P.; BATISTA-SANTOS, P.; RODRIGUES, A.P.; ANTÓNIO LEITÃO, E.; RAMALHO, J.C. Low temperature impact on photosynthetic parameters of coffee genotypes. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 44, n. 11, p. 1404-1415, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009001100006>.
- PELOSO, A.F.; TATAGIBA, S.D.; REIS, E.F.; PEZZOPANE, J.E.M.; AMARAL, J.F.T. Limitações fotossintéticas em folhas de cafeeiro arábica promovidas pelo déficit hídrico. *Coffee Science*, v. 12, n. 3, p. 389-399, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v12i3.1314>

PERDOMO, J.A.; CAPÓ-BAUÇÀ, S.; CARMO-SILVA, E.; GALMÉS, J. Rubisco and Rubisco Activase Play an Important Role in the Biochemical Limitations of Photosynthesis in Rice, Wheat, and Maize under High Temperature and Water Deficit. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 490, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.00490>.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 869-882, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erq340>.

PRASCH, C. M.; SONNEWALD, U. Simultaneous application of heat, drought, and virus to Arabidopsis plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiology*, v. 162, p. 1849-1866, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.221044>.

RAHN, E.; LÄDERACH, P.; BACA, M.; CRESSY, C.; SCHROTH, G.; MALIN, D.; VAN RIKXOORT, H.; SHRIVER, J. Climate change adaptation, mitigation and livelihood benefits in coffee production: where are the synergies? *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, v. 19, p. 1119-1137, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11027-013-9467-x>.

RAKOCEVIC, M.; FERRANDES, R.; MARCHIORI, P.E.R.; RIBEIRO, R.V. Estimating the canopy architecture and photosynthesis of *Coffea arabica* L. plants cultivated under long-term elevated air CO₂ concentration. In: *International Conference on Functional-Structural Plant Growth Modeling, Simulation, Visualization and Applications (FSPMA): Qingdao*. New York: IEEE 2017. p. 175-182, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/FSPMA.2016.7818304>.

RAMALHO, J.C.; CAMPOS, P.S.; QUARTIN, V.L.; SILVA, M.J.; NUNES, M.A. High irradiance impairments on photosynthetic electron transport, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and N assimilation as a function of N availability in *Coffea arabica* L. plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 154, p. 319-326, 1999. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80174-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80174-6).

RAMALHO, J.C.; DAMATTA, F.M.; RODRIGUES, A.P.; SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.; BATISTA-SANTOS, P.; PARTELLI, F.L.; RIBEIRO, A.; LIDON, F.C.; LEITÃO, A.E. Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 26, p. 5-18, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40626-014-0001-7>.

RAMALHO, J.C.; FORTUNATO, A.S.; GOULAO, L.F.; LIDON, F.C. Cold-Induced Changes in Mineral Content in Leaves of *Coffea* spp. Identification of Descriptors for Tolerance Assessment. *Biologia Plantarum*, v. 57, n. 3, p. 495-506, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-013-0329-x>.

RAMALHO, J.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; GUERRA, M.; REBOREDO, F.H.; MÁGUAS, C.; CARVALHO, M.L.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M. Can Elevated Air [CO₂] Conditions Mitigate the Predicted Warming Impact on the Quality of Coffee Bean? *Frontiers in Plant Science*, v. 9: art. 287, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.00287>.

RAMALHO, J.C.; PONS, T.; GROENEVELD, H.; AZINHEIRA, H.G.; NUNES, M.A. Photosynthetic Acclimation to High Light Conditions in Mature Leaves of *Coffea arabica* L.: Role of Xanthophylls, Quenching Mechanisms and Nitrogen Nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 27, p. 43-51, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/PP99013>.

RAMALHO, J.C.; QUARTIN, V.; LEITÃO, A.E.; CAMPOS, P.S.; CARELLI, M.L.; FAHL, J.I.; NUNES, M.A. Cold Acclimation Ability of Photosynthesis Among Species of the

- Tropical *Coffea* Genus. *Plant Biology*, v. 5, p. 631-641, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-44688>.
- RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; LIDON, F.C.; MARQUES, L.M.C.; LEITÃO, A.E.; FORTUNATO, A.S.; PAIS, I.P.; SILVA, M.J.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LOPES, A.; REBOREDO, F.H.; RIBEIRO-BARROS, A.I. Stress Cross-Response of the Antioxidative System Promoted by Superimposed Drought and Cold Conditions in *Coffea* spp. *PLoS ONE*, v. 13, n. 6, e0198694, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0198694>.
- RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SIMÕES-COSTA, M.C.; LEITÃO, A.E.; FORTUNATO, A.S.; BATISTA-SANTOS, P.; PALOS, I.M.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M. Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. *PLoS ONE*, v. 8, e82712, 2013b. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082712>.
- RAMALHO, J.C., ZLATEV Z.S., LEITÃO A.E., PAIS I.P., FORTUNATO A., LIDON F.C. Moderate Water Stress Causes Differential Stomatal and Non-Stomatal Changes in the Photosynthetic Functioning of *Phaseolus vulgaris* L. Genotypes. *Plant Biology*, v. 16, p. 133-146, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12018>.
- REDFEARN, E. R.; FRIEND, J. Studies on plastoquinone-1. Determination of the concentration and oxidation-reduction state of plastoquinone in isolated chloroplasts. *Phytochemistry*, v. 1, p. 147- 151, 1962.
- ROCHAIX, J.D. Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1807, p. 375–383, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.010>.
- RODRIGUES, W.P.; MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.S.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; SIMÕES-COSTA, M.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; COLWELL, F.; GOULAO, L.; MÁGUAS, C.; MAIA, R.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supraoptimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Global Change Biology*, v. 22, p. 415-431, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/gcb.13088>.
- RODRIGUES, W.P.; SILVA, J.R.; FERREIRA, L.S.; MACHADO FILHO, J.A.; FIGUEIREDO, F.A.; FERRAZ, T.M.; BERNADO, W.P.; BEZERRA, L.B.; ABREU, D.P.; CESPOM, L.; RAMALHO, J.C.; CAMPOSTRINI, E. Stomatal and Photochemical Limitations of Photosynthesis in *Coffea* sp. Plants Subjected to Elevated Temperatures. *Crop & Pasture Science*, v. 69, n. 3, p. 317-325, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/CP17044>.
- RONCHI, C.P.; ARAÚJO, F.C.; ALMEIDA, W.L.; SILVA, M.A.A.; MAGALHÃES, C.E.O.; OLIVEIRA, L.B.; DRUMOND, L.C.D. Respostas ecofisiológicas de cafeeiros submetidos ao déficit hídrico para concentração da florada no Cerrado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, n. 1, p. 24-32, 2015 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100003>.
- SALVUCCI, M. E.; CRAFTS-BRANDNER, S. J. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology*, v. 134, p. 1460-1470, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.038323.1460>.
- SANDA, S.; YOSHIDA, K.; KUWANO, M.; KAWAMURA, T.; MUNEKAGE, Y.N.; AKASHI, K.; YOKOTA, A. Responses of the photosynthetic electron transport system to

- excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. *Physiology Plant*. v. 142, p. 247-264, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01473.x>
- SANTOS, A. B.; MAZZAFERA, P. Dehydrins are highly expressed in water stressed plants of two coffee species. *Tropical plant biology*, v. 5, n. 3, p. 218-232, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12042-012-9106-9>.
- SANTOS, C.A.F.D.; LEITÃO, A.E.; PAIS, I.P.; LIDON, F.C.; RAMALHO, J.C. Perspectives on the potential impacts of climate changes on coffee plant and bean quality. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v. 27, p. 152-163, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.v27i2.19468>.
- SCHÖTTLER, M.A.; TOTH, S.Z. Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: environmental acclimation and photosynthetic flux control. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 188, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00188>.
- SCHÖTTLER, M.A.; TÓTH, S.Z.; BOULOUIS, A.; KAHLAU, S. Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: biogenesis, function, and turnover of ATP synthase and the cytochrome *b₆f* complex. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, n. 9, p. 2373-2400, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eru495>.
- SCHREIBER, U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (eds Papageorgiou GC, Govindjee), p. 279-319, 2004. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- SCHROTH, G.; LADERACH, P.; DEMPEWOLF, J.; PHILPOTT, S.; HAGGAR, J.; EAKIN, H.; CASTILLEJOS, T.; MORENO, J.G.; PINTO, L.S.; HERNANDEZ, R.; EITZINGER, A.; RAMIREZ-VILLEGAS, J. Towards a climate change adaptation strategy for coffee communities and ecosystems in the Sierra Madre de Chiapas, Mexico. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, v. 14, p. 605-625, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11027-009-9186-5>.
- SCOTTI-CAMPOS, P.; DURO, N.; DA COSTA, M.; PAIS, I.P.; RODRIGUES, A.P.; BATISTA-SANTOS, P.; SEMEDO, J.N.; LEITÃO, A.E.; LIDON, F.C.; PAWLOWSKI, K.; RAMALHO, J.C.; RIBEIRO-BARROS, A.I. Antioxidative Ability and Membrane Integrity in Salt-Induced Responses of *Casuarina glauca* Sieber ex Spreng. in Symbiosis With N₂-Fixing *Frankia* Thr or Supplemented With Mineral Nitrogen. *Journal of Plant Physiology*, v. 196, p. 60-69, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.03.012>.
- SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.P.; PARTELLI, F.L.; BATISTA-SANTOS, P.; RAMALHO, J.C. Phospholipids Profile in Chloroplasts of *Coffea* spp. Genotypes Differing in Cold Acclimation Ability. *Journal of Plant Physiology*, 171: 243-249, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.07.001>.
- SHIVHARE, D.; MUELLER-CAJAR, O. In Vitro Characterization of Thermostable CAM Rubisco Activase Reveals a Rubisco Interacting Surface Loop. *Plant Physiology*, v. 174, n. 3, p. 1505-1516, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.17.00554>.
- SILVA, V.A.; SALGADO, S.M.L.; SÁ, L.A.; REIS, A.M.; SILVEIRA, H.R.O.; MENDES, A.N.G.; BARBOSA, J.P.R.A.D.; PEREIRA, A.A. Uso de características fisiológicas na identificação de genótipos de café arábica tolerantes ao *Meloidogyne paranaenses*. *Coffee Science*, v. 10, n. 2, p. 242-250, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v10i2.868>.
- SONG, Y.; CHEN, Q.; CI, D.; SHAO, X.; ZHANG, D. Effects of high temperature on photosynthesis and related gene expression in poplar. *BMC Plant Biology*, v. 14, p. 111,

2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-14-111>.
- SONOIKE, K. Photoinhibition of photosystem I. *Physiologia Plantarum*, v. 42, p. 56-64, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01437.x>
- SPILLER, S.; TERRY, N: Limiting factors in photosynthesis. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiology*, v. 65, p. 121-125, 1980. PMID: 16661124.
- STIRBET, A.; GOVINDJEE, S.A. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology (B: Biology)*, v. 104, p. 236–257, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010>.
- SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive Oxygen Species and Temperature Stresses: A Delicate Balance between Signaling and Destruction. *Physiologia Plantarum*, v. 126, p. 45-51, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x>
- TACK, J.; BARKLEY, A.; NALLEY, L.L. Effect of warming temperatures on US wheat yields. *PNAS*, v. 112, p. 6931-6936, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1415181112>.
- TAZOE, Y.; HANBA, Y.T.; FURUMOTO, T.; NOGUCHI, K.; TERASHIMA I. Relationships Between Quantum Yield for CO₂ Assimilation, Activity of Key Enzymes and CO₂ Leakiness in *Amaranthus cruentus*, a C₄ Dicot, Grown in High or Low Light. *Plant Cell Physiology*, v. 49, n. 1, p. 19-29, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcm160>.
- TOZZI, F.R.O.; GHINI, R. Impacto do aumento da concentração atmosférica de dióxido de carbono sobre a ferrugem e o crescimento do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, p. 933-941, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2016000800005>.
- VAN BEEK, C.L.; MEERBURG, B.G.; SCHILS, R.L.M.; VERHAGEN, J.; KUIKMAN, P.J. Feeding the world's increasing population while limiting climate change impacts: linking N₂O and CH₄ emissions from agriculture to population growth. *Environmental Science & Policy*, v. 13, p. 89-96, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2009.11.001>.
- WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, v. 61, p. 199-223, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>.
- WANG, Q-L.; CHEN, J-H.; HE, N-Y.; GUO, F-Q, Metabolic Reprogramming in Chloroplasts under Heat Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 849, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030849>.
- WISE, R.R.; OLSON, A.J.; SCHRADER, S.M.; SHARKEY, T.D. Electron Transport is the Functional Limitation of Photosynthesis in Field-Grown Pima Cotton Plants at High Temperature. *Plant, Cell and Environment*, v. 27, p. 717-724, 2004. DOI: [10.1111/j.1365-3040.2004.01171.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01171.x).
- XU, Z.; ZHOU, G. Responses of Leaf Stomatal Density to Water Status and its Relationship With Photosynthesis in a Grass. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 3317-3325, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern185>.
- XU, Z.; SHIMIZU, H.; YAGASAKI, Y.; ITO, S.; ZHENG, Y.; ZHOU, G. Interactive effects of elevated CO₂, drought, and warming on plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 32, p. 692-707, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-013-9337-5>.
- YAN, K.; CHEN, P.; SHAO, H.; SHAO, C.; ZHAO, S.; BESTRIC, M. Dissection of Photosynthetic Electron Transport Process in Sweet Sorghum under Heat Stress. *PLOS ONE*,

v. 8, n. 5, e62100, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062100>.

YANG, L.; FOUNTAIN, J.C.; JI, P.; NI, X.; CHEN, S.; LEE, R.D.; KEMERAIT, R.C.; GUO, B. Deciphering drought-induced metabolic responses and regulation in developing maize kernels. *Plant Biotechnology Journal*, v. 16, p. 1616-1628, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12899>.

ZARGAR, S.M.; GUPTA, N.; NAZIR, M.; MAHAJAN, R.; MALIK, F.A.; SOF, N.R.; SHIKARI, A.B.; SALGOTRA, R.K. Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. *Plant gene*, v. 11, p. 154-159, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.003>.

ZHANG, Y.P.; WANG, Z.M.; WU, Y.C.; ZHANG, X. Stomatal characteristics of different green organs in wheat under different irrigation regimes. *Acta Agronomica Sinica*, v. 32, p. 70–75, 2006.

ZLATEV, Z. Drought-Induced Changes in Chlorophyll Fluorescence of Young Wheat Plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 23, n. 1, p. 438-441, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2009.10818458>.

ZULLO JR, J.; PINTO, H.S.; ASSAD, E.D. Impact assessment study of climate change on agricultural zoning. *Meteorological Applications*, v. 13, p. 69-80, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S135048270600257X>.

ZULLO JR, J.; PINTO, H.S.; ASSAD, E.D.; ÁVILA, A.M.H. Potential for growing Arabica coffee in the extreme south of Brazil in a warmer world. *Climatic Change*, v. 109, p. 535-548, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10584-011-0058-0>.

CAPÍTULO 5

MECANISMOS DE PROTEÇÃO EM CAFEIROS FACE AOS ESTRESSES HÍDRICOS E CALOR

RESUMO: As alterações climáticas envolvendo seca e calor tem sido dito como mais danosas à sustentabilidade das atividades agrícolas e quando ocorridas juntas potencializam os efeitos de estresse. Devemos considerar que as plantas possuem mecanismos de defesa eficientes que são ativados quando expostas a condições anômalas. A fim de verificar o desempenho de cafeeiros em condições de seca e calor isoladas e sobrepostas levaram-se aos estudos com plantas pertencendo a duas cultivares, das principais espécies produtoras: *C. arabica* L. cv. Icatu e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153). Estas foram submetidas a duas condições hídricas: bem regado (Ctl) e seca severa (SD) em condições adequadas de temperatura (25/20°C dia/noite), após o que foram expostas a temperaturas supra-ótimas crescentes até 42/30 °C, e um período de recuperação com o reestabelecimento de condições favoráveis aos 14 dias (Rec14) e por vezes aos 4 e 7-10 dias (Rec4 e Rec7-10). Foram avaliados parâmetros foliares relacionados ao estado de fotoinibição do *PSII*, a atividade de Ascorbato Peroxidase (*APX*), Glutathione Redutase (*GR*), Superóxido Dismutase (*Cu, Zn-SOD*), Ascorbato (*ASC*), enzima de choque térmico (*HSP70*), pigmentos fotossintéticos e teor de malondialdeído (MDA). Os resultados evidenciaram, de modo geral, tolerância ao calor relevante até 37/28 °C para ambos os genótipos de café bem regados, no entanto, a 42/30 °C ocorreu a fotoinibição do fotossistema II. As plantas em seca severa foram substancialmente fotoinibidas em comparação a controle, entretanto houve aumento da atividade de *APX*, *SOD* e *GR* atuando como antioxidante na remoção de espécies reativas de oxigênio (*ROS*), assim como muitos pigmentos foram mantidos por ambas as condições de estresse ou expressos de forma isolada atuando como fotoprotetor, diminuindo ou atenuando os danos causados pelas condições de estresse. Ainda, houve aumento a síntese de proteína de choque térmico (*HPS70*) com aumento de temperatura e com a seca. O teor de MDA foi aumentado apenas em 42/30 °C, mostrando a ocorrência de peroxidação de lipídios de membrana, mas evidenciando a termotolerância dos cafeeiros a temperaturas bem acima do ótimo. Assim, os cafeeiros quando bem regados tem potencial para tolerar temperaturas até 37/28 °C para maioria dos parâmetros avaliados, mas o déficit hídrico severo e a sobreposição dos estresses conferem maior limitação para o desempenho dos cafeeiros, entretanto ocorre a atuação de diversos mecanismos de defesa e capacidade resiliente de se recuperar após período de boas condições.

PALAVRAS-CHAVE: resposta antioxidante, mudança climática, café, estresse hídrico, enzimas, aquecimento global, estresse por calor, lipoperoxidação, fotoinibição, fotossíntese.

MECHANISMS OF PROTECTION IN COFFEEERS, FACE TO WATER STRESSES AND HEAT

ABSTRACT: Climatic changes involving drought and heat have been said to be more harmful to the sustainability of agricultural activities and when they occur together they potentiate the effects of stress. We must consider that plants have efficient defense mechanisms that are activated when exposed to anomalous conditions. In order to verify the performance of coffee trees in isolated and overlapping conditions of drought and heat, they were studied with plants belonging to two cultivars, of the main producing species: *C. arabica* L. cv. Icatu and *C. canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153). These were submitted to two water conditions: well watered (WW) and severe dry (SD) under appropriate temperature conditions (25/20 °C day/night), after which they were exposed to increasing temperatures up to 42/30, and a recovery period with reestablishment of favorable conditions at 14 days (Rec14) and sometimes at 4 and 7-10 days (Rec4 and Rec7-10). The foliar parameters related to the state of photoinhibition of PSII, the activity of Ascorbate Peroxidase (APX), Glutathione Reductase (GR), Superoxide Dismutase (Cu, Zn-SOD), Ascorbate (ASC), heat shock enzyme (HSP70) photosynthetic pigments and malondialdehyde content (MDA). The results showed, overall, tolerance to the relevant heat up to 37/28 °C for both genotypes of well-watered coffee, however, at 42/30 °C photoinhibition of photosystem II occurred. The plants in severe drought were substantially photoinhibited in comparison to control, however there was an increase in APX, SOD and GR activity acting as antioxidant in the removal of reactive oxygen species (ROS), as well as many pigments were maintained under both stress conditions or expressed in an isolated manner acting as a photoprotector, reducing or attenuating the damage caused by the stress conditions. In addition, there was an increase in the temperature and temperature increase of the thermal shock protein (HPS70). The MDA content was increased only at 42/30 °C, showing the occurrence of membrane lipid peroxidation, but evidencing the coffee thermotolerance at temperatures well above the optimum. Thus, when well watered, coffee plants have the potential to tolerate temperatures up to 37/28 °C for most of the evaluated parameters, but the severe water deficit and the overlapping of the stresses imply a greater limitation to the coffee trees performance,

however, defense and resilient ability to recover after a period of good conditions.

KEY WORDS: antioxidant response, climate change, coffee, water stress, enzymes, global warming, heat stress, lipoperoxidation, photoinhibition, photosynthesis.

INTRODUÇÃO

Devido a atividades antropogénicas, desde a revolução industrial no século XVIII, tem ocorrido um aumento da concentração de gases com efeito de estufa na atmosfera (IPCC, 2014) como CO₂, NH₄ e N₂O. Tal aumento impede que parte da radiação solar seja dissipada de volta ao espaço mantendo o calor ao redor do planeta, levando a aumentos perceptíveis de temperatura do ar e também alterações na distribuição das chuvas, degelo das calotas polares e aumento do nível do mar (VAN BEEK et al., 2010; IPCC, 2014; CASSIA et al., 2018; LAMAQUI et al., 2018).

O café é uma das mercadorias mais negociadas no mundo, com vendas de varejo estimado em US\$ 173.000 milhões anualmente (ICO, 2018). Estima-se que cerca de 125 milhões de pessoas estejam envolvidos em toda cadeia produtiva, atuando como renda principal para subsistência desta população (BUNN et al., 2015; MARTINS et al., 2016; DAMATTA, 2018). O café é atualmente cultivado em cerca de 80 países em desenvolvimento (RAMALHO et al., 2014; MARTINS et al., 2014; MARIAS et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018), destacando-se como maiores produtores o Brasil, Vietnã, Colômbia, Indonésia, Honduras, Etiópia, Índia e Uganda (ICO, 2018). Diariamente cerca de 2500 milhões de xícaras de café são consumidas em todo o mundo (BAGYARAJ et al., 2015), havendo perspectivas promissoras para o aumento de consumo de café nos próximos anos, principalmente entre jovens e no continente asiático.

O cafeeiro se caracteriza como uma planta perene lenhosa pertencente à família Rubiaceae. Das 125 espécies dentro do gênero *Coffea* (KRISHNAN et al., 2013) apenas duas são responsáveis por 99% da produção mundial. A espécie *Coffea arabica* L. (café Arábica) é responsável pelo maior montante de 60-65% da produção e a espécie *C. canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon (café Robusta, no Brasil denominado Conilon devido à importância dos clones desta cultivar na agricultura brasileira) responde por 35-40%. Além de estas duas espécies diferirem em aparência e origem, apresenta grande divergência em qualidade e sabor da bebida (DAVIS et al., 2011; BAGYARAJ et al., 2015; DAMATTA, 2018). Ambas as espécies têm exigências de cultivo semelhantes, mas algo distinta quando se refere à faixa de temperatura e precipitação. O cultivo da espécie *C. arabica* exige temperatura média de 18 a

22 °C e precipitação bem distribuída ao longo do ano de 1600 mm e maiores altitudes (mais frescas). Já *C. canephora* tolera temperaturas médias mais altas (22 a 30 °C) e demanda precipitação em torno de 1800 mm anuais e altitudes mais baixas, sendo normalmente considerada mais tolerante ao calor e menos ao frio do que *C. arabica* (DAMATTA e RAMALHO, 2006; RAMALHO et al., 2013a; MARTINS et al., 2014).

A cafeicultura vem passando por intensos avanços tecnológicos e científicos, com melhorias em produção e qualidade. Entretanto, previsões futuras de mudanças climáticas globais apontam para ameaças importantes para esta cultura, pois se estima aumento gradual da temperatura e maior prevalência de períodos com seca num futuro próximo, com importantes consequências ao nível da sustentabilidade da cultura do café, decréscimo de produtividade, alteração das áreas adequadas para o seu cultivo, e extinção de diversas espécies selvagens de café tão necessárias para programas de melhoramento (BUNN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016; ZARGAR et al., 2017; MOAT et al., 2019). Contudo devem também considerar-se estimativas menos drâmáticas que apontam para o fato do cafeeiro poder se beneficiar do aumento de CO₂ atmosférico que está ligado ao aquecimento global, o que mitigaria significativamente (ou anularia) o impacto do aumento de temperatura, desde que haja disponibilidade hídrica adequada (MARTINS et al., 2014; DaMATTA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016; VERHAGE et al., 2017; SEMEDO et al., 2018; DaMATTA et al., 2018; RAHN et al., 2018; DaMATTA et al., 2019).

Ainda assim, a prevalência de maior frequência de eventos climáticos extremos (de temperatura e água) pode ter consequências sobre a produção agrícola. Atualmente temperaturas elevadas e secas são as mudanças mais temidas para os ecossistemas e para a agricultura, pois afetam negativamente todos os processos fundamentais das plantas, com impacto no desenvolvimento, produção e qualidade final, inclusive no café (RAMALHO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018). Quando estas limitações ocorrerem simultaneamente é previsível que agravem ainda mais o nível de estresse (ABDELGAWAD et al., 2015; BROWN et al., 2016; MARIAS et al., 2017; DUBBERSTEIN et al., 2018, SEMEDO et al., 2018), pois o déficit hídrico e o calor excessivo têm efeito frequentemente cumulativo nos processos morfológicos e fisiológicos (PANDEY et al., 2015), podendo ocasionar reduções nos rendimentos das colheitas em até 50% (LAMAOUUI et al., 2018).

O aumento de temperatura estimula proporcionalmente mais as vias da fotorrespiração e respiração mitocondrial do que a da fotossíntese nas plantas C3 (DAMATTA et al. 2010; RODRIGUES et al., 2018). Adicionalmente, o fechamento dos estômatos é uma das primeiras respostas ao déficit hídrico, de forma a limitar a perda de água

por transpiração. Contudo, a menor abertura estomática limita igualmente a troca de calor da folha (que assim aquece mais) e a difusão de CO_2 até aos locais de carboxilação no cloroplasto, comprometendo a assimilação de carbono pela fotossíntese (MELKE e FETENE, 2014; MENEZES-SILVA et al., 2017). Com o processo fotossintético limitado decresce o uso fotoquímico de energia, a luz interceptada pelas folhas pode tornar-se excessiva e desencadear um estado saturado de poder redutor, podendo levar à formação de espécies altamente reativas de clorofila e de oxigénio (*ROS*). A produção de *ROS* é uma consequência inevitável do metabolismo aeróbico, aumentando durante condições estressantes (AWASTHI et al., 2015). Quando produzidas de forma descontrolada acabam por atuar como promotor de processos fotoinibitórios e fotooxidativos, causando, nomeadamente, peroxidação de lipídeos, danos celulares e inativação de enzimas do ciclo de Calvin (WAHID et al. 2007; DIAS et al., 2010; NOCTOR et al., 2014; MENEZES-SILVA et al., 2017; YANG et al., 2018).

Contudo, as plantas desenvolveram uma série de respostas para enfrentar condições de stresses, englobando alterações nos níveis molecular, bioquímico e fisiológico (MENEZES-SILVA et al., 2017; YANG et al., 2018; LAMAOUY et al., 2018). Essas alterações envolvem uma estreita coordenação entre os processos fisiológicos, incluindo a fotossíntese, a respiração e a fotorrespiração, a fim de evitar um desequilíbrio entre a absorção e o uso de energia luminosa (KRASENSKY e JONAK, 2012; MENESES-SILVA et al., 2017). Logo, a flexibilidade metabólica das plantas em geral, e de café em especial, nas respostas de ajuste às condições de estresse ambiental deve ser sempre considerada (RAMALHO et al., 2013a, 2014), ponderando, nomeadamente, a expressão de genes que codificam proteínas e enzimas com função antioxidativa (como Ascorbato Peroxidase e Glutathione Redutase, que atuam no Ciclo do Ascorbato-Glutatião de remoção de *ROS*), proteínas de choque térmico e expressão de genes ligados à produção de ABA, como também a síntese de pigmentos fotossintéticos com função fotoprotetora, alteração da composição da matriz lipídica membranar, etc. (RAMALHO et al., 2000; DAMATTA e RAMALHO, 2006; PARTELLI et al., 2009; FORTUNATO et al., 2010; PARTELLI et al., 2011; RAMALHO et al., 2013a; SCOTTI-CAMPOS et al., 2014; MARTINS et al., 2016; MENEZES-SILVA et al., 2017; CASSIA et al., 2018; YANG et al., 2018).

Diante disso, este trabalho tem como objetivo estudar o comportamento dos mecanismos de proteção dos cafeeiros arábica e conilon submetidos a estresse hídrico e aumento de temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e Condições Experimentais

Dois genótipos de café amplamente cultivados das duas principais espécies produtoras, *C. arabica* L. cv. Icatu e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) foram avaliados. Plantas com cerca de sete anos de idade, cultivadas em câmaras de crescimento *walk-in* (EHHF 10000, ARALAB, Portugal), em vasos de 80 L com um substrato composto por uma mistura de solo, turfa e areia (3:1:3, v/v/v) e foram mantidas em condições ambientais controladas de temperatura (25/20 °C, dia/noite), irradiância (cerca de 700-800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $[\text{CO}_2]$ no ar externo de 380 $\mu\text{L L}^{-1}$, humidade relativa (75%), fotoperíodo (12 h) e disponibilidade hídrica sem restrições.

Ao iniciar o ensaio as plantas foram submetidas a duas condições hídricas: 1) Controle (Ctl) - bem regadas, com teor relativo de água foliar de alvorada (RWC_{pd}) de cerca de 95% e potencial hídrico de alvorada (Ψ_{pd}) até cerca de 0,5 MPa, e 2) seca severa (SD) com $RWC_{pd} < 70\%$ e $\Psi_{pd} < -2,5$ MPa). Após estabilização durante *ca.* 20 dias, a temperatura foi então gradualmente aumentada (0,5 °C dia^{-1} da temperatura diurna) desde 25/20 °C (dia/noite) até 42/30 °C, com cinco dias de estabilização a 31/25, 37/28, 42/30 °C para possibilitar as avaliações programadas. Por fim, a temperatura foi reajustada para 25/20 °C e normalizado o fornecimento de água, acompanhando-se a capacidade de recuperação das plantas durante 14 dias (Rec14), num total de 83 dias desde o início de estabelecimento dos níveis de disponibilidade hídricos até ao fim do experimento.

Todas as determinações foram efetuadas a 25/20, 31/25, 37/28, 42/30 °C e a Rec14. Adicionalmente, alguns parâmetros foram também avaliados em temperaturas intermédias (28/23, 34/28, 39/30 °C), assim como ao fim de 4 (Rec4) e entre 7 e 10 (Rec7-10) dias após reestabelecimento da temperatura controle e dos níveis de disponibilidade hídrica.

As determinações foram feitas em folhas recém-maturas, localizadas na parte superior (iluminada) de cada planta. Exceto quando indicado em contrário (Relações Hídricas Foliares), as análises foram efetuadas após *ca.* 2 horas de iluminação. O material foliar coletado destinou-se a avaliações imediatas, ou foi congelado instantaneamente em N_2 líquido e armazenado a -80°C para análises posteriores (por exemplo, análises bioquímicas). Ao longo do experimento as plantas foram mantidas sem restrições nutricionais, seguindo as recomendações para a cultura.

Estado de Fotoinibição do PSII

O cálculo dos índices de fotoinibição de *PSII* (WERNER et al., 2002,) incluiu: (A) fotoinibição crônica (PI_{Chr}), representando a redução percentual em F_v/F_m em cada

temperatura em relação ao F_v/F_m máximo obtido durante todo o experimento; (B) fotoinibição dinâmica (PI_{Dyn}), representando o declínio em F_v/F_m que é totalmente reversível durante a noite, sendo medido como a redução percentual no meio do dia F_v'/F_m' em relação a F_v/F_m em cada temperatura, em relação ao máximo F_v/F_m de todo o experimento; (C) fotoinibição total ($PI_{Total} = PI_{Chr} + PI_{Dyn}$). O F_v/F_m e F_v'/F_m' representaram a máxima eficiência fotoquímica do *PSII* (avaliado em amostras adaptadas à escuridão) e a eficiência real do *PSII* da conversão de energia (obtido à luz em equilíbrio dinâmico de fotossíntese).

Caracterização de Pigmentos Fotossintéticos

Carotenóides (Car) foram avaliados a partir de três discos foliares congelados (cada 0,5 cm²). O processamento da amostra e subsequente HPLC em fase inversa foram levadas a cabo como otimizado para café (RAMALHO et al., 1997), com pequenas alterações, usando uma coluna C18, Spherisorb ODS-2 (250 x 4,6 mm), 5 µm de poro, com revestimentos terminais. A detecção foi realizada a 440 nm utilizando um sistema de HPLC (Beckman, System Gold, Tulsa, EUA) acoplado a um detector de diodos (Modelo 168; Beckman), e a identificação e quantificação foram realizadas usando padrões individuais de cada pigmento. O estado de desepoxidação (DEPS), envolvendo os componentes do ciclo das xantofilas, foi calculado como $DEPS = (Zeaxantina (Z) + 0.5 \text{ Antheraxantina (A)}) / (Violaxantina (V) + A + Z)$.

Para determinação das clorofilas (*Chls*) utilizou-se uma aliquota das mesmas amostras que foram diluídas de forma a ficarem em acetona a 80%, efetuando-se a quantificação espectrofotométrica, utilizando os comprimentos de onda e as fórmulas de Lichtenthaler (1987).

Atividade Máxima de Enzimas Antioxidativas do Cloroplasto

Para isolamento dos cloroplastos (Lidon e Henriques, 1993a), utilizou-se ca. 8 g FW de tecido foliar. A actividade Superóxido Dismutase (*Cu, Zn-SOD*, EC 1.15.1.1), foi determinada a 25 °C com base no método de McCord e Fridovich (1969), como descrito em detalhe em Ramalho et al. (1998) para *Coffea* sp, através da taxa inibição do ferricitocromo *c*, a 550 nm. Uma unidade de *Cu, Zn-SOD* é definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma inibição de 50% na taxa de redução do cit *c*.

A actividade enzimática da ascorbato peroxidase (*APX*) do cloroplasto foi determinada em extratos de cloroplastos (obtidos a partir de 3-4 g de FW de tecido foliar), como descrito anteriormente (RAMALHO et al., 1998). A ascorbato peroxidase (*APX*, EC 1.11.1.11) foi avaliada através do consumo de ascorbato (a 290 nm, 120 s, 25°C) usando um

coeficiente de extinção de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para cálculos.

A determinação da atividade do Glutathione Redutase (EC 1.6.4.2) foi realizada como descrito em Ramalho et al. (2008). O isolamento dos cloroplastos foi realizado de acordo com Foster e Hess (1980), utilizando 3-4 g FW de tecido foliar. A suspensão obtida foi então processada como em (Foyer et al., 1995). A atividade enzimática foi ensaiada de acordo com (Schaedle e Bassham, 1977), utilizando 2 ml de uma solução de tampão de reação de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 3 mM de MgCl_2 , 0,5 mM de GSSG e 0,15 mM de NADPH. A reação foi seguida durante cerca de 10 min após a adição de 25 ml de extrato, monitorizando a oxidação de NADPH a 340 nm. Para evitar a superestimação das atividades do *GRed*, as taxas foram corrigidas para a oxidação NADPH independente do GSSG, adicionando à cuvete de referência 25 ml de extrato e omitindo o GSSG. Soluções de NADPH entre 20 e 400 mg mL^{-1} foram usadas para obter uma curva padrão.

Quantificação de Ascorbato

Amostras de folhas (*ca.* de 100 mg FW) foram homogeneizadas em 2 mL de uma solução de ácido meta-fosfórico a 3% (w/v) e ácido acético glacial a 4% (v/v), deixadas por 15 min com agitação e submetidas a ultrassonografias (5 min). As amostras foram então centrifugadas (10.000 g, 5 min, 4 °C) e filtradas (PVDF, 0,45 mm) antes de uma análise por HPLC de fase reversa, utilizando uma coluna C18, Spherisorb ODS-2 (250 x 4,6 mm), 5 μm de poro, com revestimentos terminais e detecção a 254 nm, usando um detector UV-Vis (mod. 440, WatersMillipore Associates, EUA). A eluição das injeções de 20 mL foi realizada com H_2O a pH 2,2 (conseguida por adição de H_2SO_4) durante 15 min, com um caudal de 0,4 mL min^{-1} . Para quantificação, utilizou-se uma curva padrão de concentração de ácido ascórbico.

Quantificação de Proteína de Choque Térmico

Para a quantificação da proteína de choque térmico 70 kDa (*HSP70*) utilizou-se o método descrito detalhadamente em Martins et al. (2016), utilizando 100 mg FW de tecidos de folhas congelados. Após processamento da amostra quantificou-se a *HSP70* através de Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), usando micro placas ELISA de fundo chato (Costar, Corning, NY, USA). A absorbância foi determinada a 405 nm utilizando em um leitor de microplacas. As concentrações de *HSP70* foram detectadas comparando a absorbância da amostra com a absorbância de uma proteína *HSP70* purificada de referência. Os teores totais de proteína solúvel dos extratos enzimáticos seguiram Bradford (1976), utilizando como padrão a albumina sérica bovina (BSA).

Teor de Malondialdeído

A peroxidação lipídica foi avaliada através do teor de malondialdeído (MDA), utilizando 100-150 mg (FW) de pó de folhas congelados. As medidas de MDA foram realizadas utilizando o protocolo do ácido tiobarbitúrico (TBA). Para cálculo do teor de MDA usou-se o valor de $Abs_{532\text{ nm}}$, após a subtração do valor inespecífico a $Abs_{600\text{ nm}}$, e o coeficiente de extinção de $155\text{ mmol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (SCOTTI-CAMPOS et al., 2016).

Análise Estatística

Os parâmetros medidos e calculados foram analisados por meio de uma ANOVA two-way ($P < 0,05$) para avaliar as diferenças entre as duas condições hídricas, entre as diversas temperaturas, e sua interação, seguido pelo teste de Tukey para comparações de médias. Cada ANOVA foi realizada independentemente para cada um dos genótipos estudados. Um nível de confiança de 95% foi adotado para todos os testes.

RESULTADOS

Estado de Fotoinibição do PSII

As condições estressantes tiveram diferentes impactos no estado de fotoinibição do fotossistema (PS) II, havendo igualmente diferenças entre genótipos (Tabela 1). A seca severa aumentou significativamente as fotoinibições crônica (PI_{Chr}), dinâmica (PI_{Dyn}) e total (PI_{Tot}) em plantas de CL153 e Icatu (exceto PI_{Chr} que não alterou em Icatu). Entretanto o calor não afetou significativamente estes parâmetros até 39/30 °C, e apenas a 42/30 °C promoveu o aumento de PI_{Chr} e PI_{Tot} em ambos os genótipos.

Com a conjugação de ambos os estresses, a 42/30 °C apenas PI_{Chr} aumentou face às plantas SD a 25/20 °C, mas nas plantas Icatu-SD esse valor de PI_{Chr} foi significativamente reduzido face às plantas Ctl nessa temperatura enquanto PI_{Dyn} aumentou. Os valores de PI_{Dyn} e PI_{Tot} aumentaram em relação às respectivas plantas Ctl em CL153. De forma notável, em Rec4 os valores de PI_{Chr} e PI_{Dyn} não mostraram diferenças significativas entre Ctl e SD ambos os genótipos, apesar das plantas SD manterem valores acima dos observados nas plantas Ctl a 25/20 °C, tendência essa que se mantém mesmo em Rec14 nas plantas SD, sugerindo uma recuperação quase total.

Tabela 1. Avaliação das alterações de parâmetros de fluorescência da clorofila *a* ao nível foliar, que incluem o a PI_{Dyn} (fotoinibição dinâmica), PI_{Chr} (fotoinibição crônica) e PI_{Total} (fotoinibição total), em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (SD) e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), e temperaturas supra-ótimas de 28/23, 31/25, 34/28, 37/28, 39/32, 42/30 °C e recuperação ao fim de 4 dias (Rec4), 7 a 10 dias (Rec7-10) e 14 dias (Rec14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=8). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas entre níveis de temperatura (A, B, C, D) e mesma letra minúscula entre níveis de água (a, b) não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)									
		25/20 °C	28/23°C	31/25 °C	34/28°C	37/28 °C	39/30°C	42/30 °C	Rec4	Rec10	Rec14
PI_{Chr}											
CL 153	Ctl	5,72 \pm 0,73bBCD	3,38 \pm 0,55bBCD	3,12 \pm 0,31bCD	3,01 \pm 0,27bD	3,14 \pm 0,63bD	6,42 \pm 0,63bBCD	22,27 \pm 2,57aA	11,87 \pm 0,96bAB	11,06 \pm 1,44bBC	7,84 \pm 0,82bBCD
	SD	15,37 \pm 2,49aBCD	12,39 \pm 3,38aBCD	10,96 \pm 2,21aCD	5,88 \pm 0,80aD	6,83 \pm 0,86aD	9,30 \pm 2,17aBCD	23,28 \pm 2,47aA	18,38 \pm 0,61aAB	15,95 \pm 1,52aBC	10,67 \pm 0,61aBCD
Icatu	Ctl	7,79 \pm 0,46aB	8,83 \pm 0,65aB	6,36 \pm 0,36aB	5,80 \pm 0,94aB	9,60 \pm 0,84aB	4,76 \pm 0,19aB	39,42 \pm 6,25aA	11,82 \pm 1,21aB	10,15 \pm 0,90aB	12,47 \pm 1,66aB
	SD	6,90 \pm 1,02aB	3,81 \pm 0,47aB	4,20 \pm 0,70aB	6,86 \pm 0,75aB	9,34 \pm 1,70aAB	7,87 \pm 0,68aAB	18,42 \pm 0,97bA	13,64 \pm 1,07aAB	12,40 \pm 0,54aAB	12,32 \pm 0,84aAB
PI_{Dyn}											
CL 153	Ctl	21,70 \pm 2,37bA	20,70 \pm 3,98bA	21,27 \pm 2,76bA	26,14 \pm 3,05bA	16,79 \pm 1,73bA	18,72 \pm 3,48bA	27,41 \pm 3,43bA	27,73 \pm 5,27aA	20,57 \pm 4,90aA	19,38 \pm 2,65bA
	SD	41,38 \pm 2,90aA	29,79 \pm 2,18aA	33,72 \pm 3,57aA	38,25 \pm 1,95aA	38,65 \pm 3,83aA	36,58 \pm 4,83aA	34,92 \pm 2,90aA	27,86 \pm 1,58aA	21,28 \pm 3,61aA	24,43 \pm 2,87aA
Icatu	Ctl	19,87 \pm 2,52bA	19,81 \pm 3,31bA	11,86 \pm 2,34bA	23,46 \pm 3,79bA	16,22 \pm 2,12bA	25,84 \pm 1,82bA	26,10 \pm 4,86bA	20,77 \pm 2,41aA	20,74 \pm 2,31aA	10,71 \pm 2,67bA
	SD	38,39 \pm 2,63aAB	39,61 \pm 3,00aAB	40,33 \pm 4,16aA	41,56 \pm 4,01aA	37,40 \pm 3,25aAB	44,23 \pm 3,15aA	40,15 \pm 2,86aAB	24,44 \pm 2,64aBC	19,45 \pm 1,96aC	21,35 \pm 2,63aC
PI_{Total}											
CL 153	Ctl	27,42 \pm 2,75bAB	24,08 \pm 4,35bB	24,39 \pm 2,90bB	29,15 \pm 3,07bB	19,93 \pm 1,89bB	25,14 \pm 3,60bB	49,68 \pm 3,41bA	39,61 \pm 5,27bAB	31,63 \pm 4,66bB	27,22 \pm 2,88bB
	SS	56,75 \pm 4,45aAB	42,18 \pm 4,30aB	44,68 \pm 4,74aB	44,13 \pm 2,25aB	45,48 \pm 4,22aB	45,88 \pm 6,8aB	58,20 \pm 3,12aA	46,24 \pm 1,38aAB	37,24 \pm 3,72aB	35,10 \pm 2,83aB
Icatu	Ctl	27,67 \pm 2,65bB	28,64 \pm 3,43bB	18,22 \pm 2,16bB	29,26 \pm 3,75bB	25,82 \pm 1,75bB	30,60 \pm 1,89bB	65,52 \pm 6,26aA	32,59 \pm 1,76aB	30,89 \pm 2,27aB	23,18 \pm 2,16aB
	SS	45,29 \pm 2,41aABC	43,42 \pm 3,07aABC	44,52 \pm 4,76aABC	48,42 \pm 4,26aBCD	46,74 \pm 2,94aABC	52,09 \pm 3,40aAB	58,57 \pm 2,76aA	38,08 \pm 3,20aBC	31,84 \pm 2,32aC	33,67 \pm 2,37aC

Enzimas do Sistema Antioxidativo

As atividades das enzimas Superóxido Dismutase (*Cu/Zn-SOD*), Ascorbato Peroxidase (*APX*) e Glutathiona Redutase (*GR*) foram alteradas com as condições impostas (Tabela 2). A atividade da *Cu/Zn-SOD* aumentou com a seca em ambos os genótipos, 70% em CL153 e 267% em Icatu. Já o aumento de temperatura provocou alguma flutuação de valores (decréscimo em CL153 e manutenção em Icatu, até 37/30 °C), a 42/30 °C apenas em Icatu se observou um aumento significativo de atividade (65%). A conjugação de estresses promoveu um aumento em CL153 a 42/30 °C face às plantas Ctl nessa temperatura. Deve notar-se que nas plantas Icatu-*SD* o aumento na temperatura provocou forte decréscimo na atividade da *Cu/Zn-SOD* logo a 31/25 °C, recuperando a temperaturas superiores até apresentar a mesma atividade que as plantas Ctl a 42/30 °C. No final do período de recuperação as plantas *SD* de ambos os genótipos apresentaram valores semelhante às Ctl do início do experimento. Curiosamente as plantas Icatu-Ctl mostraram um forte aumento da atividade desta enzima em Rec14.

Tabela 2. Alterações na atividade máxima cloroplástica da enzima antioxidante Ascorbato Peroxidase (*APX*), Glutathiona Redutase (*GR*) e Superóxido Dismutase (*Cu/Zn-SOD*) em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (*SD*) e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), e temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28, 42/30 °C e recuperação ao fim de 14 dias (Rec14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=4). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas entre níveis de temperatura (A, B, C, D) e mesma letra minúscula entre níveis de água (a, b) não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	Rec14
<i>Cu/Zn-SOD</i> (Unid. Enz. g ⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	636 \pm 11bA	364 \pm 4bBC	349 \pm 4bBC	491 \pm 6bAB	334 \pm 18bC
	SD	1087 \pm 209aA	957 \pm 17aBC	1005 \pm 2aBC	1057 \pm 8aAB	692 \pm 1aC
Icatu	Ctl	607 \pm 12bC	657 \pm 26aC	613 \pm 20bC	1001 \pm 7aB	1650 \pm 5aA
	SD	2229 \pm 15aA	438 \pm 46bE	872 \pm 18aC	1020 \pm 20aB	786 \pm 3bD
<i>APX</i> (mmol ASC min ⁻¹ g ⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	9,8 \pm 1,6bB	11,2 \pm 1,1bB	10,8 \pm 1,0bB	4,5 \pm 1,3bC	16,3 \pm 0,2aA
	SD	13,8 \pm 0,5aB	17,6 \pm 3,4aAB	18,5 \pm 1,1aA	19,8 \pm 0,7aA	7,1 \pm 0,8bC
Icatu	Ctl	15,8 \pm 2,8aA	15,6 \pm 1,5aA	11,2 \pm 1,3aA	2,2 \pm 0,4Bb	2,6 \pm 0,5bB
	SD	5,1 \pm 1,6bB	5,9 \pm 0,4bB	6,2 \pm 0,5bB	16,3 \pm 1,0aA	5,9 \pm 1,0aB
<i>GR</i> (μ mol NADPH min ⁻¹ g ⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	1,075 \pm 0,109aA	1,103 \pm 0,093aA	0,616 \pm 0,172aB	0,913 \pm 0,067aAB	0,102 \pm 0,007aC
	SD	0,534 \pm 0,034bA	0,148 \pm 0,019bB	0,339 \pm 0,011bAB	0,384 \pm 0,016bAB	0,186 \pm 0,004aAB
Icatu	Ctl	1,683 \pm 0,027aAB	2,769 \pm 0,337aA	0,969 \pm 0,357aBC	0,658 \pm 0,089aBC	0,129 \pm 0,012aC
	SD	0,131 \pm 0,018bC	0,230 \pm 0,022bB	0,275 \pm 0,006bB	0,904 \pm 0,035aA	0,364 \pm 0,061aB

A 25/20 °C, atividade de *APX* aumentou com a seca em CL153 e foi reduzida em Icatu. Em ambos os genótipos, o aumento de temperatura nas plantas Ctl não teve impacto significativo na atividade até 37/28 °C, mas reduziu-a drasticamente a 42/30 °C (54% em CL153 e 86% em Icatu). Contrastando com esses resultados, as plantas submetidas a ambos os estresses (plantas *SD* a 42/30 °C) mostraram aumentos significativos em CL153 e Icatu, quer por comparação às plantas *SD* a 25/20 °C quer, principalmente, às Ctl a 42/30 °C. De fato, nesta temperatura as plantas *SD* mostraram uma atividade 340% e 640% acima das plantas Ctl para CL153 e Icatu, respectivamente. No período de recuperação apenas CL153 *SD* regressa a valor próximo ao do controle inicial.

A atividade de *GR* foi reduzida pela seca em plantas de CL153 (50%) e Icatu (92%). Com temperatura extrema de 42/30 °C apenas as plantas Icatu-Ctl apresentaram reduções significativas da atividade. Contudo, quando submetidos a ambos as condições de estresse (*SD* a 42/30 °C) as plantas Icatu mostram um aumento de atividade face às plantas *SD* a 25/20 °C ou às Ctl a 42/30 °C, observando-se tendência oposta nas plantas CL143-*SD*. Em Rec14 os valores foram menores que os registados nas respectivas plantas Ctl a 25/20 °C, revelando assim uma recuperação incompleta.

Moléculas Não-Enzimáticas de Proteção - Ascorbato, HPS70 e Carotenoides

Os teores de Ascorbato e da proteína de choque térmico com 70 kDa (*HPS70*) foram alteradas com as condições impostas (Tabela 3). Com exposição à seca, os teores de ascorbato tendem a subir em CL153 e a descer em Icatu (ainda que permanecendo com o dobro dos observados no CL153). As temperaturas supra-ótimas tiveram maior impacto com decréscimos já a 37/20 °C que atingiram 50% (apesar de não significativo) e 39% em CL153 e Icatu, respectivamente. A 42/30 °C as reduções atingiram 88% e 80%, pela mesma ordem. A exposição a ambos os estresses levou a reduções ainda maiores a 37/28 °C e 42/30 °C (exceto em CL153 nesta última). Quanto à capacidade de recuperação (Rec14) nota-se que as plantas CL153-*SD* e em ambos os nível hídricos de Icatu mostraram aumentos significativos, por comparação às plantas Ctl a 25/20 °C, sugerindo que as plantas terão ainda necessidade de manter níveis elevados desta molécula antioxidativa.

Tabela 3. Alterações na atividade de moléculas de proteção não enzimáticas Ascorbato e proteína de choque térmico *HPS70* em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (*SD*) e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), e temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28, 42/30 °C e recuperação ao fim de 14 dias (Rec14). Os valores

representam a média \pm erro padrão (n=4). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas entre níveis de temperatura (A, B, C, D) e mesma letra minúscula entre níveis de água (a, b) não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				Rec14
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	
Ascorbato (mg g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	0,236 \pm 0,036aAB	0,342 \pm 0,063aA	0,117 \pm 0,026aB	0,029 \pm 0,008aB	0,145 \pm 0,035bAB
	SD	0,333 \pm 0,053 aAB	0,226 \pm 0,076aBC	0,068 \pm 0,003aC	0,044 \pm 0,001aC	0,502 \pm 0,145aA
Icatu	Ctl	0,855 \pm 0,116aB	0,415 \pm 0,063aC	0,525 \pm 0,064aC	0,173 \pm 0,033aC	1,277 \pm 0,255aA
	SD	0,667 \pm 0,170bB	0,360 \pm 0,084bC	0,015 \pm 0,004bC	0,105 \pm 0,041bC	1,191 \pm 0,073bA
HSP70 (μg g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	0,840 \pm 0,115bC	2,148 \pm 0,063aB	2,603 \pm 0,401bA	1,297 \pm 0,251aC	0,818 \pm 0,073aC
	SD	1,368 \pm 0,073aC	2,101 \pm 0,119aB	3,481 \pm 0,071aA	1,342 \pm 0,125aC	1,046 \pm 0,097aC
Icatu	Ctl	0,913 \pm 0,077bC	2,365 \pm 0,366bAB	2,450 \pm 0,478aA	2,576 \pm 0,265aA	1,538 \pm 0,167aBC
	SD	1,682 \pm 0,093aB	3,127 \pm 0,262aA	2,471 \pm 0,190aAB	1,504 \pm 0,137bB	1,564 \pm 0,181aB

A síntese da proteína de choque térmico *HSP70* foi aumentada em ambos os genótipos devido à imposição individual de condições de seca e temperatura. Os maiores aumentos foram observados a 31/25 °C (156% 159%) e 37/28 °C (201% e 168%) para CL153 e Icatu, respectivamente. Contudo, a 42/30 °C as plantas CL153-Ctl mostram uma queda para os valores próximos dos iniciais, enquanto em Icatu se observaram valores (ainda mais) altos. Por outro lado, a imposição simultânea de estresses provocou maiores aumentos de *HSP70* nas plantas CL153-SD a 37/28 °C em relação às plantas Ctl nessas temperaturas. O mesmo efeito foi observado em Icatu a 31/25 °C. Contudo, a 42/30 °C observaram-se decréscimos nas plantas SD face aos valores de 37/28 °C, em ambos os genótipos.

Após o período de recuperação os valores de *HSP70* em CL153 aproximaram-se dos registados nas plantas Ctl no início do experimento, enquanto as plantas Icatu mostram uma tendência para manter valores aumentados.

De entre os pigmentos fotossintéticos, os carotenóides são uma conjunto importante de moléculas com funções de captação de energia (tal como as clorofilas), mas também de fotoproteção. Os carotenóides (quantificados por método de HPLC) e as clorofilas (avaliados por método espectrofotométrico) foram afetados pelas condições estressantes, pelo que se focará apenas os resultados mais relevantes, relativamente aos efeitos individuais da seca (SD), da temperatura (42/30 °C) e da imposição simultânea destas duas condições.

Relativamente aos carotenóides (Tabela 4), os teores de Neoxantina aumentaram em plantas Icatu sob estresse hídrico. Com calor e ambos os estresses Icatu mostra tendência para valores um pouco superiores ao controle, verificando-se o oposto em CL153 (e que se mantém em Rec14 neste genótipo).

Os pigmentos do ciclo das xantofilas, Violaxantina, Antheraxantina e Zeaxantina (VAZ), que são interconvertíveis entre si, mostraram diferentes padrões de variação. No geral, Violaxantina diminuiu sob estresse hídrico e calor, observando-se uma descida ainda maior sob ação de ambos os estresses e nos dois genótipos. Com a seca, a antheraxantina aumentou apenas em Icatu, não havendo impacto significativo da temperatura em ambos os genótipos. Contudo, as plantas *SD* a 42/30 °C apresentam valores superiores às Ctl nessa temperatura. A Zeaxantina mostrou maiores aumentos com a seca (400% em CL153 e 840% em Icatu), que com a temperatura (*ca* de 49% em CL153 e 90% em Icatu). Apesar de uma tendência para maiores valores nas plantas *SD* a 42/30 °C em relação às Ctl, tais valores foram bem menores do que os observados a 25/20 °C nas plantas *SD* de ambos os genótipos, pelo que a interação de estresses diminuiu a síntese de Zeaxantina em ambos os genótipos (algo já visível a 31/25 °C e 37/28 °C). Como consequência destas variações (principalmente de Zeaxantina) o estado de desepoxidação (DEPS) teve os maiores aumentos devido à seca, respondendo mais moderadamente a 42/30 °C. Nesta temperatura máxima, as plantas *SD* de ambos os genótipos mostram aumento significativo face às Ctl (a 25/20 °C ou a 42/30 °C), mas com valores algo inferiores aos observados a 25/20 °C nas plantas *SD*. Finalmente, é possível observar que as alterações nos pigmentos do ciclo das xantofilas em resposta à seca em CL153 baseou-se quase em exclusivo na transformação de pigmentos pré-existentes, enquanto em Icatu houve também significativa síntese *de novo* (aumento de 53% do conjunto/*pool* destes pigmentos). Com o calor e com ambos os estresses este *pool* tende a diminuir, embora mostrando valores que não diferem significativamente das plantas Ctl a 25/20 °C, e sendo semelhantes nas plantas Ctl e *SD* a 42/30 °C, nos dois genótipos.

Outra importante diferença entre genótipos observou-se nos teores de Luteína. Em resposta à seca este pigmento reduziu-se (20%) em CL153 e aumentou (30%) em Icatu. Com a temperatura apenas Icatu mostrou alterações significativas com um aumento gradual até 42/30 °C onde registrou o valor máximo (+59%, face a 25/20 °C). Ainda a 42/30 °C, as plantas *SD* mostraram menor valores que as Ctl em CL153 mas não em Icatu, genótipo que também manteve valores claramente superiores aos de CL153.

Relativamente aos carotenos (α e β) foi possível observar que no CL153 os valores mantêm uma relativa estabilidade, excepto β -caroteno que decresce com a exposição das plantas à seca (com ou sem calor). Em Icatu α -caroteno aumenta com seca e com calor até 37/28 °C (a 42/30 °C não há efeito nas plantas Ctl e *SD*), enquanto o β -caroteno diminui com a seca, mas aumenta com o calor até 42/30 °C. A interação de estresses tende a diminuir ambos os carotenos a 42/30 °C, de forma significativa no β -caroteno.

Como resultado das variações de α - e β -caroteno, o valor de ($\alpha+\beta$) caroteno diminuiu com a seca em CL153 e mantém-se em Icatu, mas o rácio (α/β) caroteno aumentou em ambos os genótipos. Com o calor CL153 mantém os valores de ($\alpha+\beta$) caroteno, mas Icatu mostra uma subida significativa nas duas temperaturas mais altas. A presença de ambos os estresses diminuiu o valor de ($\alpha+\beta$) caroteno a 37/30 °C e 42/30 °C em ambos os genótipos face ao valor das plantas Ctl nessa temperatura. A 42/30 °C o rácio (α/β) caroteno é afetado nas plantas CL153-Ctl, mas sob interação de estresses (plantas SD) o valor é maior que nas plantas Ctl.

Tabela 4. Mudanças no conteúdo foliar (mg g^{-1} DW) de carotenóides (xantofilas e carotenos), em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (SD) e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), e temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28, 42/30 °C e recuperação ao fim de 14 dias (Rec14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=4-5). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letra minúscula (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	Rec14
Neoxantina (mg g^{-1} DW)						
CL 153	Ctl	0,243 \pm 0,010aA	0,221 \pm 0,011aAB	0,206 \pm 0,017aAB	0,219 \pm 0,013aAB	0,196 \pm 0,028aB
	SD	0,179 \pm 0,015aAB	0,237 \pm 0,034aA	0,197 \pm 0,011aAB	0,214 \pm 0,007aAB	0,159 \pm 0,018aB
Icatu	Ctl	0,214 \pm 0,007bAB	0,242 \pm 0,017aAB	0,248 \pm 0,008bA	0,254 \pm 0,009bA	0,205 \pm 0,006aA
	SD	0,283 \pm 0,017aA	0,241 \pm 0,015aAB	0,287 \pm 0,050aA	0,270 \pm 0,021aA	0,199 \pm 0,012aB
Violaxantina (mg g^{-1} DW)						
CL 153	Ctl	0,243 \pm 0,021aA	0,216 \pm 0,013aAB	0,185 \pm 0,019aBC	0,156 \pm 0,008aC	0,148 \pm 0,013aC
	SD	0,114 \pm 0,024bAB	0,156 \pm 0,028bA	0,079 \pm 0,007bB	0,087 \pm 0,004bB	0,106 \pm 0,013bAB
Icatu	Ctl	0,278 \pm 0,011Ab	0,340 \pm 0,021aA	0,262 \pm 0,017aBC	0,189 \pm 0,011aD	0,204 \pm 0,020aCD
	SD	0,137 \pm 0,016bA	0,162 \pm 0,019bA	0,175 \pm 0,031bA	0,142 \pm 0,011bA	0,147 \pm 0,009bA
Anteraxantina (mg g^{-1} DW)						
CL 153	Ctl	0,037 \pm 0,005aB	0,031 \pm 0,003bB	0,032 \pm 0,005bB	0,045 \pm 0,006bB	0,090 \pm 0,014aA
	SD	0,045 \pm 0,00aAB	0,050 \pm 0,011aAB	0,053 \pm 0,002aAB	0,065 \pm 0,002aA	0,033 \pm 0,005bB
Icatu	Ctl	0,037 \pm 0,004bAB	0,019 \pm 0,003bB	0,024 \pm 0,004bB	0,052 \pm 0,006bA	0,056 \pm 0,007aA
	SD	0,075 \pm 0,006aA	0,060 \pm 0,010aA	0,063 \pm 0,006aA	0,069 \pm 0,010aA	0,067 \pm 0,004aA
Zeaxantina (mg g^{-1} DW)						
CL 153	Ctl	0,047 \pm 0,006bA	0,053 \pm 0,007bA	0,045 \pm 0,005bA	0,070 \pm 0,010aA	0,098 \pm 0,021aA
	SD	0,235 \pm 0,047aA	0,185 \pm 0,034aAB	0,176 \pm 0,030aAB	0,112 \pm 0,013aBC	0,059 \pm 0,014aC
Icatu	Ctl	0,048 \pm 0,006bA	0,039 \pm 0,004bA	0,038 \pm 0,009bA	0,091 \pm 0,013aA	0,059 \pm 0,008bA
	SD	0,403 \pm 0,034aA	0,164 \pm 0,045aB	0,101 \pm 0,014aB	0,117 \pm 0,023aB	0,160 \pm 0,010aB
V+A+Z (mg g^{-1} DW)						
CL 153	Ctl	0,347 \pm 0,011aA	0,300 \pm 0,013bA	0,278 \pm 0,021aA	0,260 \pm 0,020aA	0,337 \pm 0,042aA
	SD	0,394 \pm 0,038aA	0,391 \pm 0,054aA	0,309 \pm 0,029aAB	0,263 \pm 0,018aBC	0,198 \pm 0,019bC
Icatu	Ctl	0,360 \pm 0,013bA	0,397 \pm 0,020aA	0,319 \pm 0,014aA	0,318 \pm 0,008aA	0,319 \pm 0,028aA
	SD	0,552 \pm 0,033aA	0,387 \pm 0,043aB	0,339 \pm 0,041aB	0,329 \pm 0,031aB	0,373 \pm 0,013aB
DEPS						
CL 153	Ctl	0,246 \pm 0,042bB	0,250 \pm 0,024bAB	0,209 \pm 0,031bB	0,310 \pm 0,040bAB	0,405 \pm 0,045aA

Icatu	SD	0,665 ± 0,068aA	0,525 ± 0,064aA	0,628 ± 0,045aA	0,543 ± 0,015aA	0,282 ± 0,057bB
	Ctl	0,181 ± 0,018bBC	0,124 ± 0,017bC	0,141 ± 0,036bBC	0,332 ± 0,046bA	0,243 ± 0,034bAB
	SD	0,735 ± 0,029aA	0,437 ± 0,073aB	0,401 ± 0,043aB	0,439 ± 0,038aB	0,515 ± 0,024aB
Luteína (mg g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	0,785 ± 0,033aA	0,701 ± 0,030aA	0,639 ± 0,038aA	0,813 ± 0,044aA	0,771 ± 0,106aA
	SD	0,631 ± 0,045bA	0,669 ± 0,121bA	0,662 ± 0,041bA	0,741 ± 0,052bA	0,608 ± 0,074bA
Icatu	Ctl	0,713 ± 0,025bC	0,773 ± 0,044aBC	0,900 ± 0,031aB	1,136 ± 0,036aA	0,845 ± 0,050aBC
	SD	0,928 ± 0,055aAB	0,763 ± 0,070aB	0,790 ± 0,040aB	1,051 ± 0,098aA	0,832 ± 0,046aB
α-Caroteno (mg g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	0,178 ± 0,012aA	0,170 ± 0,017bA	0,195 ± 0,027aA	0,138 ± 0,027aA	0,048 ± 0,007aB
	SD	0,157 ± 0,013aB	0,220 ± 0,038aA	0,131 ± 0,014bB	0,156 ± 0,006aB	0,055 ± 0,006aC
Icatu	Ctl	0,131 ± 0,015bBC	0,161 ± 0,013aB	0,226 ± 0,024aA	0,161 ± 0,015aB	0,078 ± 0,004aC
	SD	0,198 ± 0,019aAB	0,165 ± 0,015aBC	0,230 ± 0,019aA	0,137 ± 0,022aC	0,064 ± 0,006aD
β-Caroteno (mg g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	0,190 ± 0,016aBC	0,218 ± 0,020aA	0,191 ± 0,018aBC	0,222 ± 0,017aAB	0,159 ± 0,012aC
	SD	0,098 ± 0,004bBC	0,142 ± 0,017bA	0,091 ± 0,003bBC	0,111 ± 0,010bAB	0,090 ± 0,006bC
Icatu	Ctl	0,206 ± 0,009aB	0,252 ± 0,017aA	0,266 ± 0,020aA	0,291 ± 0,017aA	0,191 ± 0,008aB
	SD	0,144 ± 0,005bAB	0,134 ± 0,005bB	0,147 ± 0,005bAB	0,175 ± 0,013bA	0,134 ± 0,006bB
(α+β) Caroteno (mg g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	0,368 ± 0,024aA	0,388 ± 0,030aA	0,386 ± 0,042aA	0,360 ± 0,041aA	0,155 ± 0,040aB
	SD	0,254 ± 0,017bB	0,362 ± 0,052aA	0,185 ± 0,031bBC	0,267 ± 0,013bAB	0,145 ± 0,011aC
Icatu	Ctl	0,338 ± 0,032aBC	0,413 ± 0,032aAB	0,491 ± 0,048aA	0,452 ± 0,031aA	0,270 ± 0,007aC
	SD	0,342 ± 0,021aA	0,299 ± 0,018bAB	0,377 ± 0,022bA	0,228 ± 0,046bBC	0,199 ± 0,011bC
(α/β) Caroteno (g g⁻¹)						
CL 153	Ctl	1,148 ± 0,116bA	0,978 ± 0,129bA	1,022 ± 0,113bA	0,584 ± 0,083bB	0,328 ± 0,071bB
	SD	1,583 ± 0,086aA	1,500 ± 0,153aA	1,435 ± 0,144aA	1,449 ± 0,120aA	0,610 ± 0,048aB
Icatu	Ctl	0,627 ± 0,060bAB	0,662 ± 0,067bAB	0,865 ± 0,084bA	0,579 ± 0,069aB	0,417 ± 0,032aB
	SD	1,360 ± 0,125aAB	1,233 ± 0,093aB	1,556 ± 0,102aA	0,758 ± 0,123aC	0,470 ± 0,029aD
Carotenoides Totais (mg g⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	1,690 ± 0,040aA	1,611 ± 0,073aA	1,478 ± 0,115aB	1,652 ± 0,109aA	1,511 ± 0,174aB
	SD	1,544 ± 0,092bA	1,658 ± 0,253bA	1,390 ± 0,078bAB	1,484 ± 0,077bAB	1,150 ± 0,119bB
Icatu	Ctl	1,625 ± 0,037bB	1,826 ± 0,091aAB	1,958 ± 0,061aAB	2,161 ± 0,053aA	1,639 ± 0,084aB
	SD	2,104 ± 0,113aA	1,690 ± 0,130aB	1,916 ± 0,240aAB	1,961 ± 0,170aAB	1,554 ± 0,071aB
(V+A+Z)/Carotenoides Totais (g g⁻¹)						
CL 153	Ctl	0,199 ± 0,005bAB	0,187 ± 0,004bABC	0,170 ± 0,004bBC	0,157 ± 0,008aC	0,223 ± 0,010aA
	SD	0,275 ± 0,018aA	0,246 ± 0,024aAB	0,220 ± 0,011aBC	0,176 ± 0,004aD	0,184 ± 0,011bCD
Icatu	Ctl	0,221 ± 0,005bA	0,218 ± 0,005aA	0,163 ± 0,006aBC	0,148 ± 0,004aC	0,193 ± 0,009bAB
	SD	0,264 ± 0,010aA	0,224 ± 0,011aB	0,178 ± 0,006aC	0,168 ± 0,008aC	0,238 ± 0,009aAB

No seu conjunto, em CL153 os carotenoides (totais) foram reduzidos devido à seca e à conjugação de estresses (a 42/30 °C), não se alterando apenas devido ao aumento de temperatura. Já em Icatu os carotenoides totais aumentaram em qualquer destas condições de estresse relativamente aos valores das plantas Ctl a 25/20 °C. Não há interação de estresses em qualquer dos genótipos, pois as plantas SD apresentaram valores semelhantes a 25/20 °C e 42/30 °C.

O rácio [(V+A+Z)/Carotenoides totais] permite avaliar a representatividade do *pool* de pigmentos do ciclo das xantofilas no total de carotenoides. O seu valor aumentou em seca, mas diminuiu com a temperatura, não havendo diferenças entre as plantas Ctl e SD e a 42/30 °C em ambos os genótipos.

De forma geral, após duas semanas de recuperação (Rec14) o teor da maior parte dos

carotenoides apresentam valores próximos (por exemplo, Neoxantina, Luteína, *pool* da componentes do ciclo das xantofilas) ou menores (por exemplo, α -caroteno, ($\alpha+\beta$) caroteno, (α/β) caroteno) face ao controlo inicial, sem diferenças muito marcadas entre os dois genótipos.

Tabela 5. Conteúdo foliar da clorofila total Chl ($a+b$), rácios de clorofila (a/b) e (carotenóides totais/clorofilas totais) em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (SD) e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), e temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28, 42/30 °C e recuperação ao fim de 14 dias (Rec14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=4-5). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letra minúscula (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				
		25/10 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	Rec14
<i>Chl (a+b) (mg g⁻¹ DW)</i>						
CL 153	Ctl	10,23 \pm 0,42aA	9,66 \pm 0,37aAB	8,64 \pm 0,65aB	9,83 \pm 0,95aAB	6,35 \pm 0,56aC
	SD	7,63 \pm 0,57bAB	10,40 \pm 1,43aA	7,54 \pm 0,49bB	8,51 \pm 0,64bAB	6,06 \pm 0,59bC
Icatu	Ctl	9,85 \pm 0,43aBC	11,97 \pm 0,67aA	11,17 \pm 0,44aAB	11,11 \pm 0,32aAB	8,50 \pm 0,29aC
	SD	11,20 \pm 0,63aA	9,31 \pm 0,55bAB	10,30 \pm 0,90aA	10,09 \pm 0,84aAB	8,18 \pm 0,30aB
<i>Chl (a/b) (g g⁻¹)</i>						
CL 153	Ctl	3,19 \pm 0,06aAB	3,27 \pm 0,07aA	2,95 \pm 0,04aBC	2,68 \pm 0,06aD	2,89 \pm 0,06aCD
	SD	3,22 \pm 0,10aA	3,08 \pm 0,11bAB	2,63 \pm 0,08bC	2,64 \pm 0,11aC	2,86 \pm 0,05aBC
Icatu	Ctl	3,14 \pm 0,08aA	3,13 \pm 0,06aA	3,19 \pm 0,04aA	2,88 \pm 0,03aB	3,15 \pm 0,06aAB
	SD	2,82 \pm 0,05bA	2,86 \pm 0,05bA	2,94 \pm 0,11bA	2,62 \pm 0,05bB	2,66 \pm 0,05bAB
<i>Chl (a+b)/Carotenóides totais (g g⁻¹)</i>						
CL 153	Ctl	4,80 \pm 0,10aA	4,94 \pm 0,06aA	4,97 \pm 0,07aA	4,58 \pm 0,09aA	4,28 \pm 0,15aB
	SD	4,70 \pm 0,14aA	5,00 \pm 0,21aA	4,74 \pm 0,10aA	4,91 \pm 0,11aA	4,41 \pm 0,10aB
Icatu	Ctl	4,79 \pm 0,08aA	4,89 \pm 0,13aA	4,79 \pm 0,08aA	3,79 \pm 0,43bB	4,17 \pm 0,14aAB
	SD	4,78 \pm 0,11aA	4,92 \pm 0,10aA	5,02 \pm 0,07aA	4,62 \pm 0,10aA	3,49 \pm 0,31bB

Também as *Chls*, que atuam como pigmentos de captação de energia, foram afetados pelas condições estressantes de seca e calor (Tabela 5). O decréscimo do teor de clorofilas ($a+b$) foi observado apenas nas plantas de CL153 submetidas a estresse hídrico ou a ambos os estresses, mas não apenas ao calor (42/30 °C). Icatu não foi afetado por nenhuma das condições de estresse até 42/30 °C. Contudo, as plantas Ctl e SD apresentaram reduções em Rec14, principalmente em CL153.

A relação de clorofilas (a/b) foi reduzida pela seca apenas em Icatu, e por 42/30 °C nos dois genótipos. Nas plantas SD de ambos os genótipos o efeito da temperatura levou a decréscimos ainda maiores deste rácio. No período de recuperação os valores subiram, mas apenas em Icatu-Ctl se observou recuperação total.

O rácio [*Chl (a+b)*/Carotenoides Totais] não foi alterado durante a imposição de qualquer dos estresses individualmente, exceto em Icatu Ctl a 42/30 °C (onde haverá um reforço dos pigmentos de dissipação face aos de captação de energia) ou em conjunto, apesar de decrescer em Rec14.

Avaliação de Lipoperoxidação

Observou-se uma interessante tendência de decréscimo dos valores de MDA, enquanto indicador de lipoperoxidação, com a exposição á seca. A temperatura tende a aumentar o nível de MDA nas plantas Ctl logo a 31/25 °C para ambos os genótipos, mas a 42/30 °C apenas Icatu tem um valor significativamente mais elevado. A imposição simultânea de estresses mostrou uma interação, pois levou a um forte aumento de MDA apenas a 42/30 °C quando comparados com as plantas Ctl a 25/20 °C (101% em CL153 e 71% em Icatu) ou com as da mesma temperatura. Em Rec14 apenas CL153 Ctl mostra valores de MDA próximos dos iniciais.

Tabela 6. MDA foliar em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, submetidas a duas condições hídricas: Controle (Bem Regada-Ctl) e Seca Severa (SD) e crescentes níveis de temperatura: controle (25/20 °C, dia/noite), e temperaturas supra-ótimas de 31/25, 37/28, 42/30 °C e recuperação ao fim de 14 dias (Rec14). Os valores representam a média \pm erro padrão (n=X). As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas (A, B, C, D) entre níveis de temperatura e mesma letra minúscula (a, b) entre níveis de água não diferem estatisticamente. A análise foi efetuada separadamente para cada genótipo.

Genótipo	Água	Temperatura (dia/noite)				
		25/20 °C	31/25 °C	37/28 °C	42/30 °C	Rec14
MDA (nmol MDA g ⁻¹ DW)						
CL 153	Ctl	209,7 \pm 16,5aB	326,8 \pm 14,3aA	198,8 \pm 9,6aB	199,1 \pm 10,2bB	212,8 \pm 19,2bB
	SD	168,0 \pm 7,7aD	256,2 \pm 25,9bBC	200,0 \pm 10,0aCD	422,1 \pm 59,3aA	307,9 \pm 34,8aB
Icatu	Ctl	194,6 \pm 11,3aB	253,3 \pm 18,3aA	218,6 \pm 15,9aB	259,4 \pm 36,0aA	266,5 \pm 21,8aA
	SD	188,4 \pm 6,7aB	243,3 \pm 11,0aAB	194,7 \pm 12,5aB	333,6 \pm 55,4aA	305,9 \pm 27,6aA

DISCUSSÃO

Em condições de campo vários fatores de estresse como temperaturas extremas e escassez de água frequentemente ocorrem em simultâneo, podendo causar interações que ampliam ou diminuem as respostas/impactos causados pelos estresses individuais no metabolismo, equilíbrio mineral e expressão gênica. No que respeita à exposição a temperaturas elevadas e déficit hídrico, ambas as condições podem potencialmente afetar todos os componentes fotossintéticos, nomeadamente no cafeeiro, onde causam o fechamento

estomático (reduzindo fotossíntese líquida e o metabolismo do açúcar), alterando complexos pigmentares, reduzindo a eficiência fotoquímica e atividade das enzimas, etc. (DAMATTA e RAMALHO, 2006; RAMALHO et al., 2018; DUBBERSTEIN et al., 2018; SEMEDO et al., 2018).

Fotoinibição de PSII Devido ao Déficit Hídrico e Aumento de Temperatura

Quando organismos fotossintéticos são expostos a estresses abióticos, a atividade fotossintética pode ser significativamente diminuída (ver também Cap. 4). A fotoinibição do *PSII* pode influenciar o fluxo de elétrons fotossintéticos e o crescimento total das plantas (TIKKANEN et al., 2014; WEI et al., 2018). Na maquinaria fotossintética, o *PSII* é um dos locais frequentemente afetados, num fenômeno referido como fotoinibição do *PSII*. O excesso de energia luminosa é comum a diversos tipos de estresses, por exemplo, por promover o fecho estomático (como a seca), ou por reduzir a velocidade das reações enzimáticas (como o frio), podendo levar à inativação e/ou dano do *PSII* (assim como inibir os processos de reparação, nomeadamente da proteína D1), frequentemente associados à sobreprodução de espécies reativas de oxigênio (*ROS*) (LOGAN, 2005; NISHIYAMA e MURATA, 2014; GURURANI et al., 2015).

Neste trabalho, foram calculados índices que permitem avaliar dois componentes da fotoinibição: a fotoinibição dinâmica ($PI_{D_{dyn}}$) e a crônica (PI_{Chr}). A fotoinibição dinâmica tem a ver com a diminuição do funcionamento do *PSII* devido a mecanismos de regulação e fotoproteção. Por exemplo, se houver acumulação de pigmentos de dissipação térmica de energia (como a Zeaxantina), os valores de F_v/F_m e/ou F_v'/F_m' diminuirão sem que tal corresponda a dano, sendo que normalmente a taxa fotossintética máxima é mantida. A fotoinibição crônica ocorre com a exposição a níveis de energia excessivos para a capacidade de uso da planta e quando os mecanismos fotoprotetores de dissipação (e de remoção de *ROS*) já não são suficientes para proteger a maquinaria fotossintética (MARTINS et al., 2016). Nestas circunstâncias poderá diminuir a eficiência quântica e a taxa fotossintética máxima, estando associada ao dano e substituição da proteína D1 do centro de reação do *PSII* (ARAUJO e DEMINICIS, 2009).

Em plantas bem regadas os valores de PI_{Chr} e Total PI do *PSII* permaneceram quase inalterados até 39/30 °C, e a fotoinibição dinâmica ($PI_{D_{dyn}}$) não foi alterada por esta temperatura considerada bem acima do ótimo para *C. arabica* e *C. canephora* (DAMATTA e RAMALHO, 2006). Assim, os resultados evidenciam uma considerável tolerância ao calor da maquinaria fotossintética do cafeeiro, acompanhada pela manutenção do uso de energia

fotoquímica (Cap. 4). Entretanto, a 42/30 °C observaram-se aumentos significativos de PI_{Chr} em relação aos demais pontos avaliados, o que está de acordo com as severas reduções em F_v/F_m na maior temperatura para ambas as espécies e condições (Cap. 4, Tabela 4), e confirma resultados anteriores de aumento da PI_{Chr} a 42 °C (MARTINS et al., 2016). Apesar da diminuição da relação F_v/F_m ser um indicador de efeito fotoinibitório quando as plantas estão submetidas a estresse ambientais (ARAUJO e DEMINICIS, 2009), deve-se ter em atenção a acumulação de pigmentos fotoprotetores, nomeadamente a baixa temperatura (RAMALHO et al., 2003; PARTELLI et al., 2009; RAMALHO et al., 2018). Tal explica, pelo menos em parte, o decréscimo de F_v/F_m (e principalmente de F_v'/F_m' avaliado á luz), tendo em conta o aumento moderado de Zeaxantina, assim como de Luteína nas plantas Ctl a 42/30 °C.

Por outro lado, tem sido demonstrado que plantas submetidas ao estresse hídrico moderado não apresentam decréscimo na atividade potencial do $PSII$, entretanto, sob estresse hídrico severo ocorre um marcante efeito fotoinibitório, caracterizado por um decréscimo significativo do rendimento quântico (ARAUJO e DEMINICIS, 2009). Assim, quando a energia luminosa absorvida pelos pigmentos do $LHCII$ é maior do que a energia consumida, a fotoinibição do $PSII$ aumenta (NISHIYAMA e MURATA, 2014; TIKKANEN e ARO, 2014; GURURANI et al., 2015), devido à produção descontrolada de ROS que causam danos oxidativos nos componentes celulares (WANG et al., 2018). A inativação induzida pela luz (ou fotodano) do $PSII$ e a reparação do $PSII$ fotodanificado ocorrem simultaneamente. Assim, a fotoinibição do $PSII$ torna-se aparente quando a taxa de fotodanos excede a taxa de reparo.

Um crescente número de evidências revelou que o reparo de $PSII$ é o evento crítico que determina a tolerância do $PSII$ ao estresse abiótico, que é inibido pelas tensões abióticas (NISHIYAMA e MURATA, 2014). Os nossos resultados mostram que, o estresse hídrico promoveu acréscimos particularmente importantes de PI_{Dyn} e Total em ambos os genótipos, mas apenas moderados de PI_{Chr} em CL153 (Tabela 1), revelando uma prevalência de mecanismos de proteção mesmo em condições de seca severa, e confirmando o reforço dos mecanismos de aclimação (de dissipação térmica) refletidos no $Y_{(NPQ)}$ e q_N (Cap 4), e no fortíssimo aumento de Zeaxantina e Luteína, principalmente em Icatu, permitindo um menor impacto na eficiência fotoquímica do $PSII$ (F_v/F_m , F_v'/F_m') neste genótipo. Por outro lado, a temperatura extrema (42/30 °C) levou ao aumento de PI_{Chr} , (apesar do valor de $Y_{(NO)}$ apenas aumentar em Icatu) e muito mais moderado de PI_{Dyn} (acompanhando também um aumento menor de Zeaxantina). Finalmente, a 42/30 °C a sobreposição de estresses aumentou o valor de PI_{Dyn} e diminuiu o de PI_{Chr} (este apenas em Icatu), ambos em relação às plantas Ctl nessa temperatura. Isto é consistente com a tendência os maiores valores de $Y_{(NPQ)}$ e q_N , e menores

de $Y_{(NO)}$, assim como de maiores valores de Zeaxantina nas plantas *SD* em relação às Ctl nesta temperatura, demonstrando que mesmo nestas condições extremas de estresse combinado há mecanismos de fotoproteção atuando, o que justifica (pelo menos parcialmente) o significativo decréscimo de eficiência fotoquímica do *PSII*, *i.e.*, pelo menos parte dessa descida será atribuída a processos de *downregulation* e não a dano, ajudando a justificar a clara recuperação de alguns parâmetros já em Rec4, por exemplo, F_0 e F_v'/F_m' .

De fato, no contexto de moléculas de proteção estão englobados diversos carotenoides. Esta classe de pigmentos lipossolúveis naturais encontrados principalmente em plantas, algas e bactérias fotossintéticas, desempenha um papel central na fotossíntese, como complexos de coleta de luz, mas também como fotoprotetores reduzindo a quantidade de energia que pode atingir os complexos de clorofila (MARTINS et al., 2016; FARALONI E TORZILLO, 2017), prevenindo a sobre-redução da cadeia de transporte de elétrons e a sobre-acidificação do lúmen do tilacóide, que pode tornar o *PSII* mais sensível ao fotodano (DAMATTA e RAMALHO, 2006). Além disso, a transferência de energia das clorofilas para alguns carotenoides do ciclo das xantofilas (principalmente a Zeaxantina) leva à dissipação de energia na forma de calor (ARAÚJO E DEMINICIS, 2009; WADA et al., 2013), assim como à dissipação de energia de formas excitadas de Chl e O_2 (pelos carotenos). Nossos resultados evidenciaram que maioria dos carotenoides quantificados foi alterada pelo calor e déficit hídrico (Tabela 4), com maiores alterações promovidas pela seca e pela conjugação de estresses a 42/30 °C, em ambos os genótipos, apesar de algumas diferenças entre eles.

Icatu mostra aumentos mais generalizados ou maiores valores de carotenóides do que CL153 em resposta à seca (Neoxantina, Zeaxantina, *pool* do ciclo das xantófilas, Luteína, α -Caroteno, ($\alpha+\beta$) Caroteno), e um DEPS mais elevado, pelo que disporá de uma maior proteção conferida por estes pigmentos, o que, como referido acima, concorda com os seus baixos níveis de PI_{Chr} e, principalmente, com o aumento de PI_{Dyn} (Tabela 1). Contudo, deve sublinhar-se que nenhum dos genótipos mostra aumento dos níveis de lipopexidação (MDA) em relação à seca severa (Tabela 6), o que está de acordo com a maior importância do *pool* de pigmentos das xantofilas [(V+A+Z)/Carotenóides Totais].

O calor promove alterações menos claras nos carotenoides em ambos os genótipos. Ainda assim, observaram-se tendências para decréscimo (*pool* do ciclo das xantófilas) ou aumento (Luteína, β -Caroteno) destes pigmentos, sublinhando-se o aumento de Carotenoides Totais apenas em Icatu. De novo, a variação do teor de MDA não revela impacto importante, apesar do aumento de PI_{Chr} .

Por sua vez, a presença de ambos os estresses (*SD*, 42/30 °C) permitiu maiores valores, relativamente às plantas Ctl nessa temperatura, apenas de Zeaxantina (CL153 e Icatu) e Neoxantina (Icatu), destacando-se o decréscimo de Luteína e Carotenoides Totais (CL153), assim como de β -Caroteno e $\alpha+\beta$ Caroteno (ambos os genótipos). Ainda assim, os valores de Luteína e β -Caroteno nas plantas *SD* de Icatu foram mantidos a níveis superiores aos de CL153. Incrementos em Zeaxantina indicam a presença de capacidade protetora dos *LHCs* de ambos os fotossistemas contra o excesso de energia de excitação, controlando a formação de $^3\text{Chl}^*$ e $^1\text{Chl}^*$ e removendo grupos epoxi das ligações duplas oxidadas dos ácidos graxos dos lípidios das membranas dos cloroplastos (MARTINS et al., 2016; RAMALHO et al. 2018).

Em ambos os genótipos, o decréscimo de β -caroteno nas plantas *SD* relativamente às Ctl a 42/30 °C terá diminuído a capacidade de proteção dos centros de reação do *PSII*, mas a manutenção de valores mais elevados em Icatu (também de Luteína) poderá ajudar a explicar o nível mais baixo de lipoperoxidação (MDA) nestas plantas em relação ao CL153. De fato, a Luteína e o β -caroteno podem preservar as células do dano oxidativo (FARALONI e TORZILLO, 2017), atuando na diminuição de formação de espécies altamente reativas de ^3Cl e $^1\text{O}_2$, prevenindo o seu impacto oxidativo nas membrana e fotossistemas, e protegendo o complexo Cyt *b₆/f* de fotodano promovido por $^1\text{O}_2$ (MARTINS et al., 2016; PEREIRA et al., 2018). Tal está ainda de acordo com os impactos moderados na atividade de transporte de elétrons ao nível de ambos os *PSs* com a seca e/ou 42/30 °C (Cap. 4, Tabela 5), apesar dos impactos nos teores de diversos transportadores de elétrons (Cap 4, Tabela 6) restringidas praticamente às condições mais severas de conjugação de ambos os estresses.

A manutenção, dos teores de Chl (*a+b*) sugere a inexistência de desorganização ao nível dos complexos antena, contrariamente ao que é frequentemente observado, pois a exposição prolongada a temperaturas altas (LAMAOUÏ et al., 2018) e seca (GHASSEMI et al., 2019) pode desencadear uma diminuição no conteúdo de *Chl*. Ainda assim, o rácio *Chl* (*a/b*) foi reduzido com estresse hídrico (Icatu), temperatura (42/30 °C, para ambos os genótipos) e com ambos os estresses em CL153 e Icatu (37/28 e 40/30 °C). Desta forma, não se deve descartar que essas diminuições possam refletir alguma suscetibilidade às condições de estresse, pois o decréscimo do rácio *Chl* (*a/b*) indica uma perda preferencial de Chl *a*, e foi interpretado como refletindo uma degradação seletiva da *Chl a* do *PSI* e impactos no complexo do *PSI*, associada à inibição do *PSII* em cafeeiros submetidos a alta irradiância (NUNES et al., 1993) e baixa temperatura (BATISTA-SANTOS et al., 2011). Adicionalmente, observou-se que o aumento do rácio *Chl* (*a/b*) ocorre genótipos de outras espécies tolerantes ao calor (BITA e GERATS, 2013) e possivelmente ao estresse hídrico.

Esta degradação seletiva de *Chl a* terá relação com a maior capacidade sequestradora de radical, sendo que a *Chl a* é muito mais forte que a da *Chl b* (WADA et al., 2013). Deve, contudo notar-se que não ocorreram impactos significativos na atividade potencial de *PSII* e *PSI* com a aplicação individual de estresses, havendo impacto significativo com a conjugação de condições de estresse, embora menor em Icatu (Cap. 4, Tabela 5).

Por outro lado, aumentos de algumas clorofilas e carotenóides observados em condições de estresse, podem proporcionar uma recuperação mais rápida da atividade fotossintética após a reidratação (FRIOSI et al., 2017).

Mecanismos Adicionais de Proteção

Outros mecanismos de proteção estão igualmente envolvidos, nomeadamente os relacionados com o controle do estresse oxidativo, que pode ocorrer como um estresse secundário quando as plantas são submetidas a condições ambientais limitantes. Os cloroplastos são uma importante fonte celular de *ROS* que, quando produzidos em excesso, devem ser prontamente removidos para proteger os tilacóides e moléculas (como, enzimas) no estroma (RAMALHO et al., 2018). Os sistemas de eliminação de *ROS* são constituídos por componentes enzimáticos, como a Superóxido Dismutase (*SOD*), Ascorbato Peroxidase (*APX*) e Glutathione Redutase (*GR*), e não-enzimáticos, como o Ascorbato (*ASC*), que funcionam de forma complementar para manter a homeostase celular, prevenindo danos oxidativos (FORTUNATO et al., 2010; MARTINS et al., 2016; URBAN et al., 2017; WANG et al., 2018; GHASSEMI et al., 2019).

Estes mecanismos são particularmente necessários (e por isso frequentemente reforçados em muitas espécies vegetais) em condições de estresse ambiental, sendo decisivos no processo de aclimação do cafeeiro, nomeadamente, a condições de baixa (RAMALHO et al., 2003; FORTUNATO et al., 2010; BATISTA-SANTOS et al., 2011) e alta temperatura (MARTINS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016), alta irradiância (RAMALHO et al., 1997; 1998; 2000), seca (LIMA et al., 2002; RAMALHO et al., 2018) e deficiência nutricional (CARELLI et al., 2006; POMPELLI et al. 2010; RAMALHO et al., 2013a).

Atividade da *Cu/Zn-SOD* foi aumentada em função da seca (em ambos os genótipos) e do calor (apenas Icatu). Contudo, as plantas CL153-*SD* mantiveram atividade elevada até 42 °C enquanto Icatu oscilou nas primeiras temperaturas, mas a 42/30 °C de ambos os genótipos apresentam valores semelhantes. A *Cu/Zn-SOD* atua removendo o radical superóxido ($O_2\bullet^-$) mas produzindo H_2O_2 , que ainda se caracteriza por ser altamente tóxica devido à sua própria

ação e porque pode ser transformada em radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) por meio da reação de Haber-Weiss. Portanto, H_2O_2 deve ser igualmente eliminado o que pode acontecer por ação da APX (em conjunto com a ASC) e da catalase (RAMALHO et al., 2018; CASSIA et al., 2018), a última das quais normalmente mais ativa em *C. arabica* que em *C. canephora* (FORTUNATO et al., 2010).

No que diz respeito a atividade da APX, houve decréscimos com o aumento de temperatura em ambos os genótipos, entretanto a seca gerou aumentos em CL153 mas não em Icatu (Tabela 2). As plantas bem regadas apresentaram diminuições na atividade de APX com aumento de temperatura, possivelmente por que o calor não seja tão danoso ao cafeeiro quando este está bem hidratado. Distintamente aos nossos dados, Martins et al. (2016) verificou aumento da atividade de APX com calor em plantas de CL153 em boas condições hídricas. Adicionalmente, a presença de condições extremas de estresse (*SD* a 42/30 °C) provocou um forte aumento da atividade desta enzima, o que poderá refletir a presença de substrato (H_2O_2), e a necessidade de remoção/eliminação (CASSIA et al., 2018), provavelmente resultante da alta atividade da *Cu/Zn-SOD*, refletido no forte aumento de lipoperoxidação nas plantas *SD* a 42/30 °C, em ambos os genótipos (Tabela 6).

A atividade de *GR* foi reduzida pela seca e pelo calor, principalmente em Icatu, embora com ambos os estresses as plantas Icatu-*SD* mostrem uma recuperação e valores algo acima quer das suas plantas Ctl quer das CL153-*SD*, a 42/30 °C. Esses resultados evidenciam uma quebra na atuação da *GR* no sistema antioxidativo, tal como previamente observado em Icatu, mas não em CL153 (MARTINS et al., 2016). A *GR* é a última enzima do ciclo ascorbato/glutationa e desempenha o papel principal na proteção das células contra danos induzidos pelo estresse oxidativo, favorecendo a manutenção do pool de GSH, intensificando a resposta antioxidante da planta (LABUDDA e AZAM, 2014). O aumento da atividade de *GR* e *Cu/Zn-SOD* foi igualmente observada em *C. arabica* cv. Icatu e *C. canephora* cv. Apoatã sob condições de seca, frio e sua interação (RAMALHO et al., 2018)

A análise do antioxidante não-enzimático *ASC* mostrou acentuados decréscimos devido ao aumento de temperatura e na conjugação dos dois estresses, em ambos os genótipos (Tabela 3), tal como observado para temperaturas superiores a 31 °C (MARTINS et al., 2016). Estes decréscimos poderão limitar a sua atuação como antioxidante e a atividade da APX. Contudo, os valores muito baixos nas plantas *SD* a 42/30 °C poderão ter também resultado do aumento de atividade desta enzima que usa *ASC* como substrato, não havendo posterior regeneração adequada da molécula de *ASC* no Ciclo do Ascorbato-Glutatião, pela Monodesidroascorbato Redutase, ou ao nível do *PSI* (com intervenção da Ferredoxina),

apesar da atividade do *PSI* ter sido pouco afetada pelas condições de estresse (Cap. 4, Tabela 5). Deve ainda salientar-se que o *ASC* é igualmente utilizado na reação de produção de Zeaxantina a partir de Violaxantina, pelo que o seu decréscimo máximo a 42/30 °C (plantas Ctl e *SD*) pode também estar ligado de forma parcial à produção de Zeaxantina. De acordo com Ramalho et al. (2018) *ASC* apresenta forte dinâmica nos cafeeiros sendo um pouco sensível à seca moderada, como confirmado no nosso trabalho para seca severa. Esta molécula se destaca como um dos principais antioxidantes nas plantas, uma vez que desintoxica as *ROS* e mantém a função fotossintética (CHENG et al., 2015). Contudo, no nosso caso, este componente do sistema parece não ter sido eficiente em proteger o aparato fotossintético contra as condições estressantes. Deve ser ressaltado que em condições severas de estresse a capacidade dos mecanismos protetores pode ser insuficiente (ARAUJO E DEMINICIS, 2009), ainda pode ocorrer diminuição nas atividades dos antioxidantes enzimáticos (*SOD*, *CAT*, *APX*, *GR*), devido à sua desnaturação em temperatura alta (AWASTHI et al., 2015).

A *HPS70* mostrou forte acúmulo promovido pelo o déficit hídrico e/ou temperatura até 37/28 °C nos dois génotipos (Tabela 3). Apenas Icatu-Ctl manteve valores aumentados a 42/30 °C, embora nesta temperatura todas as plantas apresentaram valores superiores às respectivas plantas Ctl a 25/20 °C. Estes resultados confirmam o impacto no aumento de *HSP70* a partir de temperaturas moderadas (31 °C), a maioria mantida até 42 °C (*C. arabica*) ou até 37 °C no CL153 (diminuindo depois) (MARTINS et al., 2016). Fica claro que a síntese de proteínas de choque térmico (*HSPs*) é uma resposta importante ao estresse térmico em *Coffea* spp., o que deve ser realçado, pois este reforço é frequentemente associado ao aumento da termotolerância (LAMAOUUI et al., 2018), auxiliando no dobramento de proteínas e impedindo a agregação irreversível de proteínas (DOU et al., 2014; PARK e SEO, 2015; CHENG et al., 2015; WANG et al., 2018). O seu aumento e ação protetora pode igualmente estender-se a outras condições estressantes, dentre estas a seca (WADA et al., 2013; PARK e SEO, 2015), como ocorreu em nosso trabalho.

Lipoperoxidação

As variações do teor de MDA, enquanto produto final deste processo tem sido amplamente utilizado como marcador de lesão lipídica oxidativa causada por estresse ambiental (KONG et al., 2016; TOSCANO et al., 2016). Como foi sendo referido ao longo da discussão, verificou-se que a presença de MDA aumentou significativamente quando as plantas estiveram expostas a ambas as condições de estresse, mas apenas a 42/30 °C, o que

reflete a alta resiliência do cafeeiro às condições impostas neste trabalho. Apesar disso, podemos concluir que, nestas condições extremas, os sistemas de defesa mostraram limitações para proteger as membranas contra a lipoperoxidação, que é um dos principais efeitos prejudiciais da atuação das *ROS*. Investigações comparativas em duas cultivares de *Brassica campestris* L. (sensíveis e tolerantes ao calor) mostraram que maior severidade do dano ao aparato fotossintético e ao sistema de membranas foi observada em cultivares sensíveis ao calor, devido ao alto acúmulo de *ROS* e *MDA* (ZOU et al., 2017; WANG et al., 2018), enquanto *MDA* aumentou significativamente após 30 dias de estresse hídrico em dois tipos de arbustos ornamentais (TOSCANO et al., 2016).

CONCLUSÕES

Os impactos da seca são evidentes tanto em CL153 quanto em Icatu no que se refere a todos os parâmetros de fotoinibição. Entretanto em relação a PI_{Chr} moderada em CL153 e ausente em Icatu evidencia atuação de mecanismos de proteção, capacidade de aclimação refletidos por $Y_{(NPQ)}$ e qN e maiores teores de Zeaxantina e Luteína principalmente em Icatu.

No que se refere a temperatura nota-se que de modo geral, há uma tolerância relevante até 37/28 °C para ambos os genótipos de café bem regados, mas, a 42/30 °C a fotoinibição da fotossíntese se manifesta de forma mais evidentes (PI_{Chr} e PI Total). A junção de calor e seca evidenciou a interações dos efeitos de estresse, sendo que a 42/30°C houve aumentos consideráveis na PI_{Chr} , mas plantas de Icatu *SD* apresentaram menor fotoinibição crônica a 42 °C em comparação a plantas controle, possivelmente ocasionado pelo aumento da atividade de alguns antioxidantes atuando na remoção de *ROS*. Sendo que atuação mais evidente foi verificada normalmente em condição de seca e temperatura de 37 a 42 °C por *APX*, *SOD*, *GR* (em Icatu *SD* e CL 153 *SD* e Ctl a 42 °C) e *HPS70*. Aumento da atividade do Ascorbato foi evidente apenas para CL 153 com imposição da seca.

Quanto aos pigmentos fotossintéticos o déficit hídrico severo e temperatura de 42/30 °C desencadearam alterações, entretanto alguns se mativeram estáveis (ex: neoxantina em CL 153, Chl (*a+b*), Chl (*a+b*)/carotenoides totais) o que não é totalmente ruim, outros foram aumentados pela sobreposição de seca e calor (Anteraxantina, Zeaxantina, DEPS) sendo estes fotoprotetores muito importantes, houve ainda alguns que diminuíram com a seca e aumentaram com o calor (Luteína, β -caroteno, $\alpha+\beta$ -caroteno e carotenoides totais HPLC), ou vice-versa (α/β caroteno), diminuídos pela sobreposição das duas condições estressantes (Violaxantina e Chl *a/b*), como também a atuação de estresses isolados com aumentos ocasionados somente por calor (Carotenoides totais espectrofotometro) ou diminuído ($V+A+Z$, α -caroteno,

V+A+Z/carotenoides totais) e até mesmo aumentos ocasionados somente por seca (Neoxantina em Icatu), logo, possivelmente maioria dos pigmentos atuaram como fotoprotetores diante das condições estressantes.

O teor de MDA que quantifica a peroxidação lipídica foi aumentado apenas a 42/30 °C em CL153 e Icatu (exceto CL153 Ctl), o que reflete a alta resiliência do cafeeiro a temperaturas acima do ótimo e até mesmo quando submetidas ao estresse hídrico. Podendo estar ligado à manutenção e aumentos da maioria dos antioxidantes (*APX*, *SOD* e *GR*) e alguns pigmentos fotossintéticos como relatado a cima.

Ainda, a capacidade de resiliência dos cafeeiros é comprovada pela considerável capacidade de recuperação de muitos parâmetros após alguns dias de reestabelecimento de rega e temperatura controle.

AGRADECIMENTOS

Os trabalhos deste capítulo contaram com o apoio financeiro da União Europeia, através do Projecto BreedCAFS (proposta 727934), Programa Horizonte 2020, Edital, H2020-SFS-2016-2, Ação RIA, assim como de fundos nacionais da Fundação para a Ciência e a Tecnologia através das Unidades de Investigação UID/AGR/04129/ 2013 (LEAF) e UID/GEO/04035/2013 (GeoBioTec).

Bolsas da CAPES (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) Processo n°: 88881.132375/2016-01, Danielly Duberstein) e do CNPq, atribuídas a Fábio L. Partelli e Fábio M. DaMatta são também altamente reconhecidas.

REFERÊNCIAS

- ABDELGAWAD, H.; FARFAN-VIGNOLO, E.R.; DE VOS, D.; ASARD, H. Elevated CO₂ mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Science*, v. 231, p. 1-10, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.001>.
- ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B. Fotoinibição da Fotossíntese. *Brazilian Journal of Biosciences*, v. 7, n. 4, p. 463-472, 2009. Disponível: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1009>.
- AWASTHI, R.; BHANDARI, K.; NAYYAR, H. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Frontiers in Environmental Science*, v. 3, p. 11, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00011>.
- BAGYARAJ, D.J.; THILAGAR, G.; RAVISHA, C.; KUSHALAPPA, C.G.; KRISHNAMURTHY, K.N.; VAAST, P. Below ground microbial diversity as influenced by coffee agroforestry systems in the Western Ghats, India. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 202, p. 198-202, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.01.015>.

- BATISTA-SANTOS P., LIDON F.C., FORTUNATO A., LEITÃO A.E., LOPES E., PARTELLI F., RIBEIRO A.I., RAMALHO J.C. The Impact of Cold on Photosynthesis in Genotypes of *Coffea* spp. Photosystem Sensitivity, Photoprotective Mechanisms and Gene Expression. *Journal of Plant Physiology*, v. 168, p. 792-806, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.013>.
- BITA, C.E., GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science*, v. 4, p. 273, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273>.
- BRADFORD, M.M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- BUNN, C.; LÄDERACH, P.; RIVERA, O.O.; KIRSCHKE, D. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Climatic Change*, v. 129, p. 89-101, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10584-014-1306-x>.
- CAMPOS P.S., QUARTIN V., RAMALHO J.C., NUNES M.A. Electrolyte Leakage and Lipid Degradation Account for Cold Sensitivity in Leaves of *Coffea* sp. *Plants. Journal of Plant Physiology*, v. 160, p. 283-292, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833>.
- CARELLI, M.L., FAHL, J.I., RAMALHO, J.C. Aspects of Nitrogen Metabolism in Coffee Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, n. 1, p. 9-21, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100002>.
- CASSIA, R.; NOCIONI, M.; CORREA-ARAGUNDE, N.; LAMATTINA, L. Climate Change and the Impact of Greenhouse Gasses: CO₂ and NO, Friends and Foes of Plant Oxidative Stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 273, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00273>.
- CHENG, Z.; DONG, K.; G.E, P.; BIAN, Y.; DONG, L.; DENG, X.; LI, X.; YAN, Y. Identification of Leaf Proteins Differentially Accumulated between Wheat Cultivars Distinct in Their Levels of Drought Tolerance. *PLoS ONE*, v. 10, n. 5, e0125302, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125302>.
- DAMATTA FM, GODOY AG, MENEZES-SILVA PE, MARTINS SCV, SANGLARD LMVP, MORAIS LE, TORRE-NETO A, GHINI R. Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: Disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of Experimental Botany*. v. 67, p. 341-352, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv463>.
- DAMATTA, F. M. Coffee tree growth and environmental acclimation. Chapter taken from: Lashermes, P. (ed.), *Achieving sustainable cultivation of coffee*, Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, 2018. ISBN: 978 1 78676 152 1. DOI: <http://dx.doi.org/10.19103/AS.2017.0022.02>.
- DAMATTA, F.M.; AVILA, R.T.; CARDOSO, A.A.; MARTINS, S.C.V.; RAMALHO, J.C. Physiological and Agronomic Performance of the Coffee Crop in the Context of Climate Change and Global Warming: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66: 5264-5274, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04537>.
- DAMATTA, F.M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, B.C.; BUCKERIGDE, M.S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International*, v. 43, p. 1414-1423, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.11.001>.

- DAMATTA, F.M.; RAHN, E.; LÄDERACH, P.; GHINI, R.; RAMALHO, J.C. Why Could the Coffee Crop Endure Climate Change and Global Warming to a Greater Extent Than Previously Estimated? *Climatic Change*, v. 152, p. 167-178, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10584-018-2346-4>.
- DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, p. 55-81, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202006000100006>.
- DAVIS, A.P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M.F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 167, p. 357-377, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>.
- DIAS, A.S.; BARREIRO, M.G.; CAMPOS, P.S.; RAMALHO, J.C.; LIDON, F.C. Wheat cellular membrane thermotolerance under heat stress. *Journal Agronomy of Crop Science*, v. 196, p. 100-108, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2009.00398.x>.
- DOU, H.; XU, K.; MENG, Q.; LI, G.; YANG, X. Potato plants ectopically expressing *Arabidopsis thaliana CBF3* exhibit enhanced tolerance to high temperature stress. *Plant, Cell & Environment*, v. 38, n. 1, p. 61-72, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/pce.12366>.
- DUBBERSTEIN, D.; RODRIGUES, W.P.; SEMEDO, J.N.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; REBOREDO, F.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LIDON, F.C.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Mitigation of the Negative Impact of Warming on the Coffee Crop: The Role of Increased Air [CO₂] and Management Strategies. In: Shanker, A. (Edi). *Climate Resilient Agriculture, Strategies and Perspectives*. Londres: IntechOpen, Cap. 4, p. 58-85, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.72374>.
- FARALONI, C.; TORZILLO, G. Synthesis of Antioxidant Carotenoids in Microalgae in Response to Physiological Stress. In: CVETKOVIC, D. (Edi). *Carotenoides*. IntechOpen, 2017, cap. 9, p. 702. DOI: <https://doi.org/10.5772/67843>.
- FORTUNATO, A.; LIDON, F.C.; BATISTA-SANTOS, P.; LEITÃO, A.E.; PAIS, I.P.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal Plant Physiology*, v. 167, p. 333-342, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.10.013>.
- FOSTER, J.G.; HESS, J.L. Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant Physiology*, v. 66, p. 482-487, 1980.
- FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants, *Physiologia Plantarum*, v. 92, p. 696-717, 1994.
- FROSI, G.; HARAND, W.; OLIVEIRA, M.T.; PEREIRA, S.; CABRAL, S.P.; MONTENEGRO, A.A.A.; SANTOS, M.G. Different physiological responses under drought stress result in different recovery abilities of two tropical woody evergreen species. *Acta Botanica Brasiliica*, v. 31, p. 153-160, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-33062016abb0375>.
- GHASSEMI, S.; GHASSEMI-GOLEZANI, K.; SALMASI, S.Z. Changes in antioxidant enzymes activities and physiological traits of ajowan in response to water stress and hormonal

- application. *Scientia Horticulturae*, v 246, p. 957-964, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.086>.
- GURURANI, M.A.; VENKATESH, J.; TRAN, L.S.P. Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress-Induced Photoinhibition. *Molecular Plant*, v. 8, n. 9, p. 1304-1320, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>.
- ICO (International Coffee Organization). Trade statistics. Available in: <http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf>. Acessado em 22 de Janeiro de 2018.
- KONG, W.; LIU, F.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; FENG, H. Non-destructive determination of Malondialdehyde (MDA) distribution in oilseed rape leaves by laboratory scale NIR hyperspectral imaging. *Scientific Reports*, v. 6, p. 35393, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep35393>.
- KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, p. 1593-1608, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/err460>.
- KRISHNAN, S.; RANKER, T. A.; DAVIS, A. P.; RAKOTOMALALA, J. J. An assessment of the genetic integrity of ex situ germplasm collections of three endangered species of *Coffea* from Madagascar: implications for the management of field germplasm collections. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 60, n. 3, p. 1021-1036, 2013, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9898-3>.
- LABUDDA, M.; AZAM, F.M.S. Glutathione-dependent responses of plants to drought: a review. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, v. 83, n. 1, p. 3-12. DOI: <https://doi.org/10.5586/asbp.2014.003>
- LAMAOU, M.; JEMO, M.; DATLA, R.; BEKKAOU, F. Heat and Drought Stresses in Crops and Approaches for Their Mitigation. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, p. 26, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00026>.
- LICHTENTHALER, H.K.. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*, v. 148, p. 350-382, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).
- LIDON, F.C.; HENRIQUES, F.S. Changes in the contents of the photosynthetic electron carriers, RNase activity and membrane permeability, triggered by excess copper in rice. *Photosynthetica*, v. 28, p. 99-108, 1993.
- LIMA, A.L.S., DAMATTA, F.M., PINHEIRO, A.H., TOTOLA, M.R., LOUREIRO, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, v. 47, p. 239-247, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00130-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00130-7).
- LOGAN BA. Reactive Oxygen Species and Photosynthesis. In: Smirnoff N, editor. *Antioxidants and Reactive Oxygen in Plants*. Oxford: Blackwell Publishing; p. 250-267. 2005.
- MARTINS, M.Q.; RODRIGUES, W.P.; FORTUNATO, A.S.; LEITÃO, A.E.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SILVA, M.J.; REBOREDO, F.H.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.J.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Protective Response Mechanisms to Heat Stress in Interaction with High [CO₂] Conditions in *Coffea* spp. *Frontiers in Plant*

- Science, v. 29, p. 947-964, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00947>.
- MCCORD, J.M.; FRIDOVISH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). The Journal of Biological Chemistry, v. 244, p. 6049-55, 1969
- MELKE, A.; FETENE, M. Eco-physiological basis of drought stress in coffee (*Coffea arabica*, L.) in Ethiopia. Theoretical and Experimental Plant Physiology, v. 26, p. 225-239, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40626-014-0022-2>.
- MENEZES-SILVA, P.E.; SANGIARD, L.M.P.V.; ÁVILA, R.T.; MORAIS, L.E.; MARTINS, S.C.V.; NOBRES, P.; PATREZE, C.M.; FERREIRA, M.A.; ARAÚJO, W.L, FERNIE, A.R.; DAMATTA, F.M. Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. Journal of Experimental Botany, v. 68, p. 4309-4322, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx211>.
- MOAT, J.; GOLE, T.W.; DAVIS, A.P. Least concern to endangered: Applying climate change projections profoundly influences the extinction risk assessment for wild Arabica coffee. Global Change Biology, v. 25, p. 390-403, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.14341>
- NISHIYAMA, Y.; MURATA, N. Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, p. 8777-8796, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6020-0>.
- NJEMINI, R.; DEMANET, C.; METS, T. Determination of intracellular heat shock protein 70 using a newly developed cell lysate immunometric assay. Journal of Immunological Methods, v. 274, p. 271-279, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00004-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00004-8).
- NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C.H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. Plant Physiology, v. 164, p. 1636-1648, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.113.233478>.
- NUNES M.A., RAMALHO J.C., DIAS M.A. Effect of Nitrogen Supply on the Photosynthetic Performance of Leaves from Coffee Plants Exposed to Bright Light. Journal of Experimental Botany, v. 44, n. 262, p. 893-899, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/44.5.893>.
- PANDEY, P.; RAMEGOWDA, V.; SENTHIL-KUMAR, M. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. Frontiers in Plant Science, v. 6, p. 723-737, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00723>.
- PARK, C.J.; SEO, Y.S. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. The plant pathology journal, v. 31, n. 4, p. 323-33, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>.
- PARTELLI F.L., BATISTA-SANTOS P., CAMPOS P.S., PAIS I.P., QUARTIN V.L., VIEIRA H.D., RAMALHO J.C. Characterization of the Main Lipid Components of Chloroplast Membranes and Cold Induced Changes in *Coffea* sp. Environmental and Experimental Botany, v. 74, p. 194-204, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.06.001>.
- PARTELLI F.L., VIEIRA H.D., VIANA A.P., BATISTA-SANTOS P., LEITÃO A.E., RAMALHO J.C. Low Temperature Impact on Photosynthetic Parameters in Coffee Genotypes. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 44, n. 11, p. 1404-1415, 2009. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009001100006>.

PEREIRA, S.; FROSI, G.; OLIVEIRA, M.T.; LUSTOSA, B.M.; ARRUDA, E.P.; SANTOS, M.G. Changes in phenotypic variability of two tropical woody species due to short and long-term exposure to different irradiances. *Bragantia*, v. 77, n. 3, p. 429-439, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.2017229>.

POMPELLI, M.F., MARTINS, S.C.V., ANTUNES, W.C., CHAVES, A.R.M., DAMATTA, F.M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. *Journal of Plant Physiology*, v. 167, p. 1052-1060, 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.03.001>.

RAHN, E.; VAAST, P.; LÄDERACH, P.; VAN ASTEN, P.; JASSOGNE, L.; GHAZOUL, J. Exploring adaptation strategies of coffee production to climate change using a process-based model. *Ecological Modelling* v. 371, p. 76-89, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.01.009>.

RAMALHO J.C., PAIS I.P., LEITÃO A.E., GUERRA M., REBOREDO F.H., MÁGUAS C., CARVALHO M.L., SCOTTI-CAMPOS P., RIBEIRO-BARROS A.I., LIDON F.C., DAMATTA F.M. Can Elevated Air [CO₂] Conditions Mitigate the Predicted Warming Impact on the Quality of Coffee Bean? *Frontiers in Plant Science*, v. 9: art287, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00287>.

RAMALHO J.C., PONS T., GROENEVELD H., AZINHEIRA H.G., NUNES M.A. (2000) Photosynthetic Acclimation to High Light Conditions in Mature Leaves of *Coffea arabica* L.: Role of Xanthophylls, Quenching Mechanisms and Nitrogen Nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 27, p. 43-51, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1071/PP99013>.

RAMALHO J.C., QUARTIN V., LEITÃO A.E., CAMPOS P.S., CARELLI M.L., FAHL J.I., NUNES M.A. Cold Acclimation Ability of Photosynthesis Among Species of the Tropical *Coffea* Genus. *Plant Biology*, v. 5, p. 631-641, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2003-44688>.

RAMALHO, J.C.; CAMPOS, P.S.; TEIXEIRA, M.; NUNES, M. A. Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Science*, v. 135, p. 115-124, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00073-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00073-9).

RAMALHO, J.C.; DAMATTA, F.M.; RODRIGUES, A.P.; SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.; BATISTA-SANTOS, P.; PARTELLI, F.L.; RIBEIRO, A.; LIDON, F.C.; LEITÃO, A.E. Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 26, p. 5-18, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40626-014-0001-7>.

RAMALHO, J.C.; FORTUNATO, A.S.; GOULAO, L.F.; LIDON, F.C. Cold induced changes in mineral content in leaves of *Coffea* spp. Identification of descriptors for tolerance assessment. *Biologia Plantarum*, v. 57, p. 495-506, 2013a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0329-x>.

RAMALHO, J.C.; PONS, T.; GROENEVELD, H.; NUNES, M.A. Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposure in relation to N availability. *Physiologia Plantarum*, v. 101, p. 229-239, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01841.x>.

RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; LIDON, F.C.; MARQUES, L.M.C.; LEITÃO, A.E., FORTUNATO, A.S.; PAIS, I.P.; SILVA, M.J.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LOPES, A.;

- REBOREDO, F.H.; RIBEIRO-BARROS, A.I. Stress cross-response of the antioxidative system promoted by superimposed drought and cold conditions in *Coffea* spp.. PLOS ONE, v. 13, n. 6, e0198694, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198694>.
- RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SIMÕES-COSTA, M.C.; LEITÃO, A.E.; FORTUNATO, A.S.; BATISTA-SANTOS, P.; PALOS, I.M.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M. Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. PLoS ONE, v. 8, e82712, 2013b. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082712>.
- RODRIGUES, W.P.; MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.S.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; SIMÕES-COSTA, M.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; COLWELL, F.; GOULAO, L.; MÁGUAS, C.; MAIA, R.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supraoptimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. Global Change Biology, v. 22, p. 415-431, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.13088>.
- RODRIGUES, W.P.; SILVA, J.R.; FERREIRA, L.S.; MACHADO FILHO, J.A.; FIGUEIREDO, F.A.M.M.A., F. T.M.; BERNADO, W.P.; BEZERRA, L.B.S.; ABREU, D.P.; CESPOM, LETÍCIA.; RAMALHO, J.C.; CAMPOSTRINI, E. Stomatal and photochemical limitations of photosynthesis in coffee (*Coffea* spp.) plants subjected to elevated temperatures. Crop and Pasture Science, v. 69, p. 317-325, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1071/CP17044>.
- SCHAEDLE, M.; BASSHAM, J.A. Chloroplast glutathione reductase. Plant Physiology, v. 59, p. 1011–1012, 1977.
- SCOTTI-CAMPOS P., PAIS I.P., PARTELLI F.L., BATISTA-SANTOS P., RAMALHO J.C. Phospholipids Profile in Chloroplasts of *Coffea* spp. Genotypes Differing in Cold Acclimation Ability. *Journal of Plant Physiology*, v. 171, p. 243-249, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.07.001>.
- SCOTTI-CAMPOS, P.; DURO, N.; DA COSTA, M.; PAIS, I.P.; RODRIGUES, A.P.; BATISTA-SANTOS, P.; SEMEDO, J.N.; LEITÃO, A.E.; LIDON, F.C.; PAWLOWSKI, K.; RAMALHO, J.C.; RIBEIRO-BARROS, A.I. Antioxidative Ability and Membrane Integrity in Salt-Induced Responses of *Casuarina glauca* Sieber ex Spreng. in Symbiosis With N₂-Fixing *Frankia* Thr or Supplemented With Mineral Nitrogen. *Journal of Plant Physiology*, v. 196, p. 60-69. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.03.012>.
- SEMEDO, J.N.; RODRIGUES, W.P.; DUBBERSTEIN, D.; MARTINS, M.Q.; MARTINS, L.D.; PAIS, I.P.; RODRIGUES, A.P.; LEITÃO, A.E.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A.; REBOREDO, F.H.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.J.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Coffee Responses to Drought, Warming and High [CO₂] in a Context of Future Climate Change Scenarios. In: ALVES, F.; LEAL FILHO, W.; AZEITEIRO, U. (Edi). Climate Change Management. Theory and Practice of Climate Adaptation. Springer, Cap. 26, p. 465-477. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72874-2>.
- THALMANN, M.; SANTELIA, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist*, v. 214, n. 3, p. 943–951, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14491>.
- TIKKANEN, M.; ARO, E.M. Integrative regulatory network of plant thylakoid energy

- transduction. *Trends Plant Science*, v. 19, p. 10-17, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.09.003>.
- TOSCANO, S.; FARIERI, E.; FERRANTE, A.; ROMANO, D. Physiological and Biochemical Responses in Two Ornamental Shrubs to Drought Stress. *Frontiers in plant science*, v. 7, art 645, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00645>.
- URBAN, L.; AARROUF, J.; BIDEL, L.P.R. Assessing the Effects of Water Deficit on Photosynthesis Using Parameters Derived from Measurements of Leaf Gas Exchange and of Chlorophyll *a* Fluorescence. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, art2068, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02068>.
- VAN BEEK, C.L.; MEERBURG, B.G.; SCHILS, R.L.M.; VERHAGEN, J.; KUIKMAN, P.J. Feeding the world's increasing population while limiting climate change impacts: linking N₂O and CH₄ emissions from agriculture to population growth. *Environmental Science & Policy*, v. 13, p. 89-96, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2009.11.001>.
- VERHAGE FYF, ANTEM NPR, SENTELHAS PC. Carbon dioxide fertilization offsets negative impacts of climate change on Arabica coffee yield in Brazil. *Climatic Change*, v. 144, p. 671-685, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10584-017-2068-z>
- WADA, N.; SAKAMOTO, T.; MATSUGO, S. Multiple roles of photosynthetic and sunscreen pigments in cyanobacteria focusing on the oxidative stress. *Metabolites*, v. 3, n. 2, p. 463-83, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo3020463>.
- WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. HEAT tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, v. 61, p. 199–223, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>.
- WANG, Q-L.; CHEN J-H.; HE, N-Y., GUO, F-Q. Metabolic Reprogramming in Chloroplasts under Heat Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 3, p. 849, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19030849>.
- WEI, H.; SHI-BAO, Z.; TAO, L. Moderate Photoinhibition of Photosystem II Significantly Affects Linear Electron Flow in the Shade-Demanding Plant *Panax notoginseng*. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 637, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00637>.
- WERNER, C., CORREIA, O., BEYSCHLAG, W. Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Functional Plant Biology*, v. 29, p. 999-1011, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1071/PP01143>.
- YANG, L.; FOUNTAIN, J.C.; JI, P.; NI, X.; CHEN, S.; LEE, R.D.; KEMERAIT, R.C.; GUO, B. Deciphering drought-induced metabolic responses and regulation in developing maize kernels. *Plant Biotechnology Journal*, v. 16, p. 1616-1628, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.12899>.
- ZARGAR, S.M.; GUPTA, N.; NAZIR, M.; MAHAJAN, R.; MALIK, F.A.; SOFI, N.R.; SHIKARI, A.B.; SALGOTRA, R.K. Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. *Plant Gene*, v. 11, p. 154-159, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.003>.
- ZOU, M.; YUAN, L.; ZHU, S.; LIU, S.; GE, J.; WANG, C. Effects of heat stress on photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of a heat-sensitive and heat-tolerant cultivar of wucai (*Brassica campestris* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 39, n. 30, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2319-z>.