

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

FABIANO COSTA SANTILIANO

**EXPRESSÃO GÊNICA E CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE GENÓTIPOS DE
Coffea canephora SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES HÍDRICAS**

ALEGRE, ES

2023

FABIANO COSTA SANTILIANO

**EXPRESSÃO GÊNICA E CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE GENÓTIPOS DE
Coffea canephora SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES HÍDRICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento.

Orientadora: Prof. Dr^a Taís Cristina Bastos Soares.

Coorientador: Dr. Willian Silva Barros

ALEGRE, ES


ABRIL – 2023

EXPRESSÃO GÊNICA E CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE GENÓTIPOS DE *Coffea canephora* SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES HÍDRICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Genética e Melhoramento.


25 de abril de 2023

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 TAIS CRISTINA BASTOS SOARES
Data: 22/05/2023 14:51:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profª Drª Taís Cristina Bastos Soares (UFES)

Orientadora e Presidenta da Comissão

Documento assinado digitalmente
 PAULO CEZAR CAVATTE
Data: 23/05/2023 08:44:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Paulo Cezar Cavatte (UFES)

Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
 GILZA BARCELOS DE SOUZA
Data: 22/05/2023 17:04:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Drª. Gilza Barcelos de Souza (UFES)

Examinadora Interna

Documento assinado digitalmente
 LUCIMARA CRUZ DE SOUZA
Data: 23/05/2023 14:04:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª Lucimara Cruz de Souza (UFLA)

Examinadora Externa

Documento assinado digitalmente
 RODRIGO MONTE LORENZONI
Data: 22/05/2023 23:41:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr Rodrigo Monte Lorenzoni (SEBRA S.A)

Examinador Externo

DEDICO

À minha esposa Bethânia e meu filho Nickolas

Aos meus pais Marly e José

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me permitir mais essa conquista pessoal e profissional, me mantendo de pé e me abençoando com sabedoria, força e perseverança diante dos obstáculos diários.

À minha esposa Bethânia e meu amado filho Nickolas, bênçãos de Deus em minha vida, meus maiores incentivadores e que tiveram uma enorme paciência durante estes quatro anos, entendendo meus momentos de estresse, ausência retribuindo sempre com muito amor, carinho e afeto. Amo vocês!

Aos meus pais José e Marly, meu irmão Thiago, minha sogra Marina e demais familiares e amigos que sempre me deram apoio.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de cursar o doutorado.

A todos os professores que contribuíram com muitos momentos de aprendizado e troca de experiências.

Às secretárias do programa Sabrina e Fernanda pelo trabalho exemplar.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo campus Venda Nova do Imigrante pela concessão do afastamento que me permitiu finalizar o curso.

À minha orientadora Dr^a Taís Cristina Bastos Soares, que esteve presente em cada momento desta jornada, compartilhando seus ensinamentos, suas experiências, suas palavras de conforto nos momentos difíceis. Você foi e sempre será muito mais que uma orientadora e me orgulho demais em ter seu nome gravado em meu currículo. Que Deus te abençoe sempre!

Ao Professor e co-orientador Dr. Willian Silva Barros pelos ensinamentos e ajuda primordial na realização das análises estatísticas.

Aos amigos do BqMol (Laboratório Bioquímica e Biologia Molecular), Conceição, Adelson, Lucimara, Poliane, Jheniffer, Franciele, Carlos Eduardo (Cadu), Letícia, Gabriel, Vitor Zuim, Fernanda, Paula, Mariana, Matheus, José Dias, Prof. Fábio Demolinari e à queridíssima Soninha. À técnica Magda e ao amigo Vinícius Fiorese.

À comissão examinadora, Dr. Paulo César Cavatte, Dr. Rodrigo Monte Lorenzoni, Dr^a Gilza Barcelos de Souza, Dr^a Lucimara Cruz de Souza e Dr^a Emanuele Catarina da Silva Oliveira e Dr^a Franciele Barros de Souza Sobreira, por aceitarem o convite para participar de minha banca de defesa do trabalho.

Ao Prof. Dr. Elias Werner a quem eu não teria palavras para agradecer tamanha ajuda.

Agradecimento especial à Thaís Lazarino e Gilza Barcelos. Vocês foram mais que amigas, foram essenciais para que eu seguisse essa jornada, sendo conselheiras espirituais, psicólogas, fazendo tudo o que estava ao alcance para me ajudar.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma participaram deste doutorado e participam da minha vida.

RESUMO

SANTILIANO, Fabiano Costa, D.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, abril de 2023. **Expressão gênica e características bioquímicas de genótipos de *Coffea canephora* submetidos a diferentes condições hídricas.** Orientadora: Taís Cristina Bastos Soares. Coorientador: Willian Silva Barros.

O café é uma cultura de grande importância para o cenário econômico do Brasil e do mundo. Com as previsões de mudanças climáticas, especialmente relacionadas ao déficit hídrico, tem ocorrido uma crescente busca por materiais mais adaptados à seca. Este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas moleculares por meio da expressão diferencial dos genes *CcMPR1*, *RBCS1* e *CcGoIS1* e respostas bioquímicas de 14 progênies jovens de *C. canephora* visando identificar genótipos com maior desempenho na condição de déficit hídrico. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação no delineamento de blocos ao acaso com 14 tratamentos (genótipos) e 2 fatoriais (irrigado e déficit), divididos em 3 blocos, totalizando 84 plantas experimentais para as análises moleculares, e divididos em 4 blocos, totalizando 112 plantas experimentais para as análises bioquímicas. Estes genótipos foram submetidos ao déficit hídrico por limitação da irrigação de forma lenta e prolongada para posterior avaliação dos níveis de expressão dos genes *CcMPR1*, *RBCS1* e *CcGoIS1*, todos envolvidos nas respostas do cafeeiro à seca. Avaliou-se também o comportamento dos genótipos com relação aos parâmetros bioquímicos de composição de nitrato, nitrogênio orgânico, prolina e compostos fenólicos foliares nas condições de irrigado, déficit hídrico moderado, déficit hídrico severo e recuperação pós reidratação. De acordo com as análises de expressão gênica realizadas é possível observar que os genes *CcMPR1*, *RBCS1* e *CcGoIS1* apresentaram expressão diferencial nas distintas condições de déficit a que os genótipos foram submetidos, mostrando também que a maior parte dos genótipos conseguiu se recuperar após reidratação. Os teores de nitrogênio orgânico e prolina foram os parâmetros bioquímicos que apresentaram as maiores diferenças entre os genótipos, podendo ser utilizados como marcadores de estresse hídrico, indicando a adoção de mecanismos relacionados à osmorregulação em resposta à seca.

Palavras-chaves: *CcMPR1*; *RBCS1*; *CcGoIS1*; análises bioquímicas; déficit hídrico.

ABSTRACT

SANTILIANO, Fabiano Costa, D.Sc., Universidade Federal Do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, abril de 2023. **Gene expression and biochemical characteristics of *Coffea canephora* genotypes under different water conditions.** Advisor: Dr^a Taís Cristina Bastos Soares. Co- advisor: Dr. Willian Silva Barros.

Coffee is a crop of great importance to the economic scenario of Brazil and the world. With predictions of climate change, especially related to water deficit, there has been an increasing search for materials more adapted to drought. This study aimed to evaluate the molecular responses through differential gene expression of *CcMPR1*, *RBCS1*, and *CcGoIS1* genes, as well as the biochemical responses of 14 young progenies of *C. canephora*, aiming to identify genotypes with better performance under water deficit conditions. The study was conducted in a greenhouse using a randomized block design with 14 treatments (genotypes) and two factors (irrigated and deficit), divided into three blocks, totaling 84 experimental plants for molecular analyses, and divided into four blocks, totaling 112 experimental plants for biochemical analyses. These genotypes were subjected to water deficit by gradually and prolonged irrigation limitation for subsequent evaluation of the expression levels of *CcMPR1*, *RBCS1*, and *CcGoIS1* genes, all involved in the coffee plant's response to drought. The behavior of the genotypes was also evaluated regarding the biochemical parameters of nitrate composition, organic nitrogen, proline, and leaf phenolic compounds under irrigated conditions, moderate water deficit, severe water deficit, and post-rehydration recovery. According to the gene expression analyses, it is possible to observe that the *CcMPR1*, *RBCS1*, and *CcGoIS1* genes showed differential expression under the different water deficit conditions to which the genotypes were subjected, also showing that the majority of genotypes were able to recover after rehydration. The levels of organic nitrogen and proline were the biochemical parameters that showed the greatest differences among genotypes and could be used as markers of water stress, indicating the adoption of osmoregulation mechanisms in response to drought.

Keywords: *CcMPR1*; *RBCS1*; *CcGoIS1*; water deficit.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

A – Fotossíntese líquida
ABA – Ácido abiscísico
APX – ascorbato peroxidase
DEG – Gene diferencialmente expressos
EC – peroxidases do tipo guaiacol
EP – Erro padrão da média
FT – Fenol total
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
gs – Condutância estomática
NH₄ – Nitrogênio orgânico
NO₃ – Nitrato
PCR – Reação em cadeia da polimerase
Prolina – aminoácido prolina
qPCR – PCR quantitativo em tempo real
RFO – Oligossacarídeos da família da rafinose
ROS – espécies reativas de oxigênio
SOD – superóxido dismutases
M6PR – manose-6-fosfato redutase

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Perfil de Expressão Diferencial de Genes Envolvidos nas Respostas de *Coffea canephora* em Diferentes Condições Hídricas

Figura 1. Expressão relativa do gene *CcMPR1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno em diferentes estágios de déficit hídrico..... 48

Figura 2. Expressão relativa do gene *CcMPR1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno nos clones 120 e 109 no controle irrigado e nas condições de déficit hídrico moderado, severo e recuperação.....50

Figura 3. Comparação da expressão relativa do gene *CcMPR1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno nos diferentes genótipos no controle irrigado e nas condições de déficit hídrico moderado, severo e recuperação..... 51

Figura 4. Expressão relativa do gene *RBCS1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno em diferentes estágios de déficit hídrico.....55

Figura 5. Expressão relativa do gene *RBCS1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno nos genótipos 120 e 109 no controle irrigado e nas condições de déficit hídrico moderado, severo e recuperação..... 56

Figura 6. Comparação da expressão relativa do gene *RBCS1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno nos diferentes genótipos no controle irrigado e nas condições de déficit hídrico moderado, severo e recuperação.....57

Figura 7. Expressão relativa do gene *CcGoIS1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno em diferentes estágios de déficit hídrico..... 59

CAPÍTULO 2: Características Bioquímicas Associadas à Tolerância à Seca em Genótipos de *Coffea canephora*

Figura 1: Dosagem de nitrato em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico moderado.73

Figura 2: Dosagem de nitrato em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico severo.74

Figura 3: Dosagem de nitrato em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e recuperação..... 74

Figura 4: Efeitos da redução da irrigação na dosagem de nitrato nos genótipos de *C. canephora* nas diferentes etapas de déficit hídrico..... 75

Figura 5: Dosagem de nitrogênio orgânico em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico moderado..... 77

Figura 6: Dosagem de nitrogênio orgânico em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico severo..... 77

Figura 7: Dosagem de nitrogênio orgânico em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e recuperação..... 78

- Figura 8:** Efeitos da redução da irrigação na dosagem de nitrogênio orgânico nos genótipos de *C. canephora* nas diferentes etapas de déficit hídrico..... 79
- Figura 9:** Dosagem de prolina em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico moderado..... 82
- Figura 10:** Dosagem de prolina em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico severo..... 83
- Figura 11:** Dosagem de prolina em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e recuperação..... 84
- Figura 12:** Dosagem de compostos fenólicos totais em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico moderado..... 87
- Figura 13:** Dosagem de compostos fenólicos totais em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico severo..... 88
- Figura 14:** Dosagem de compostos fenólicos totais em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e recuperação..... 88
- Figura 15:** Efeitos da redução da irrigação na dosagem de compostos fenólicos nos genótipos de *C. canephora* nas diferentes etapas de déficit hídrico..... 90

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1. Sequências de *primers* utilizados nas análises de expressão gênica.....45

CAPÍTULO 1: Perfil de Expressão Diferencial de Genes Envolvidos nas Respostas de *Coffea canephora* em Diferentes Condições Hídricas

Tabela 1. Média da expressão relativa do gene *CcMPR1* em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico..... 47

Tabela 2. Média da expressão relativa do gene *RBCS1* em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.53

Tabela 3. Média da expressão relativa do gene *CcGoIS1* em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.58

CAPÍTULO 2: Características Bioquímicas Associadas à Tolerância à Seca em Genótipos de *Coffea canephora*.

Tabela 1. Média do teor de nitrato (%) em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.....72

Tabela 2. Média do teor de nitrogênio orgânico (%) em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.76

Tabela 3. Média do teor de prolina em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.81

Tabela 4. Média do teor de compostos fenólicos (%) em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. HIPÓTESE	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. REVISÃO DA LITERATURA	17
4.1. <i>Coffea canephora</i> – origem, distribuição e importância econômica.....	17
4.2. Respostas das plantas ao estresse abiótico.....	19
4.3. Tolerância à seca em <i>Coffea canephora</i>	20
4.4. Base genética da tolerância à seca em <i>Coffea canephora</i>	27
4.5. Referências Bibliográficas	30
5. CAPÍTULO 1: Perfil de Expressão Diferencial de Genes Envolvidos nas Respostas de <i>Coffea canephora</i> em Diferentes Condições Hídricas	40
RESUMO	40
5.1. INTRODUÇÃO	41
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.2.1. Material genético	42
5.2.2. Experimento de avaliação de progênies em condições de estresse hídrico...	42
5.2.3. Condição experimental e avaliação da quantidade de água no experimento .	42
5.2.4. Experimento Molecular	43
5.2.4.1. Extração de RNA total	43
5.2.4.2. Síntese de cDNA.....	44
5.2.4.3. Análises de expressões gênicas por meio de qPCR	44
5.2.5. Análises estatísticas	45
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.3.1. Expressão do gene <i>CcMPR1</i>	46
5.3.2. Expressão do gene <i>RBCS1</i>	52
5.3.3. Expressão do gene <i>CcGoIS1</i>	57
5.4. CONCLUSÕES	61

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
6. CAPÍTULO 2: Características Bioquímicas Associadas à Tolerância à Seca em Genótipos de <i>Coffea canephora</i>.....	65
RESUMO	65
6.1. INTRODUÇÃO	66
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	67
6.2.1. Material genético	67
6.2.2. Experimento de avaliação de progênies em condições de estresse hídrico...	67
6.2.3. Condição experimental e avaliação da quantidade de água no experimento..	68
6.2.4. Análises Bioquímicas dos tecidos foliares.....	69
6.2.4.1. Quantificação de nitrato	69
6.2.4.2. Quantificação de nitrogênio orgânico.....	69
6.2.4.3. Extrato etanólico para determinação de compostos fenólicos e aminoácido prolina	70
6.2.4.3.1. Quantificação de compostos fenólicos solúveis totais	70
6.2.4.3.2. Quantificação do aminoácido prolina	71
6.2.5. Análises estatísticas	71
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
6.3.1. Análise de nitrato e nitrogênio orgânico.....	72
6.3.2. Análise de prolina.....	80
6.3.3. Análise de Compostos Fenólicos.....	86
6.4. CONCLUSÕES.....	90
6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das culturas globais mais importantes, que sustenta uma indústria multibilionária fornecendo fonte de renda para milhões de pessoas, especialmente pequenos agricultores de países em desenvolvimento (DAMATTA et al., 2018; DAVIS et al., 2020). Em termos de valores econômicos, a exportação de café brasileiro em 2022 foi de cerca de US\$ 9,2 bilhões, representando o maior valor já registrado desde o início da série histórica do produto, que ocorreu em 1997, o que corresponde a um aumento de 45% em comparação com o observado em 2021 (CONAB, 2023).

Coffea arabica L. e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner são as duas espécies do gênero *Coffea* economicamente relevantes, respondendo por 99% da produção global (DAVIS et al., 2019). Nesse sentido, embora a produção de *C. arabica* ainda represente o maior percentual do comércio de café, a importância econômica de *C. canephora* aumentou acentuadamente nas últimas décadas, especialmente no Brasil, um de seus maiores produtores (CONAB, 2023).

Entretanto, a fragilidade do cafeeiro diante das grandes oscilações de temperatura e de disponibilidade de água levanta preocupações quanto ao seu cultivo (BILEN et al., 2023). A variação anual da produção de café está relacionada principalmente à temperatura e a disponibilidade de água (DAMATTA; RAMALHO, 2006; RAMALHO et al., 2018b). Se levadas em conta as previsões climáticas de aumento das temperaturas médias globais apontadas pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) estima-se uma queda na produção mundial (IPCC, 2016; DAMATTA et al., 2018).

Em 2019, os índices pluviométricos foram adequados e distribuídos de forma equilibrada durante as fases de desenvolvimento do conilon, e, juntamente com a queda nas temperaturas em diversas regiões do Estado, o que resultou em um aumento na produção em aproximadamente 25% em relação a 2018 (CONAB, 2018; CONAB, 2019).

Para o ano de 2023 há expectativa de redução de 13% na produção, ocasionada pelo longo período de estiagem, aliado à ocorrência de baixas temperaturas. Para o conilon a estimativa de produção é de 11.460 mil sacas, representando uma redução de 7,3% em relação à safra anterior (CONAB, 2023).

Avaliações fisiológicas, bioquímicas e moleculares de cultivares podem contribuir para a compreensão da relação entre o déficit hídrico e as respostas fisiológicas das plantas sob estresse hídrico, podendo gerar parâmetros importantes para o desenvolvimento de tecnologias como, técnicas de melhoramento genético para selecionar plantas mais resistentes à seca, técnicas de manejo do solo e da água para aumentar a eficiência no uso de recursos hídricos pelas plantas, desenvolvimento de práticas agrícolas mais adequadas para áreas com restrição hídrica, e uso de tecnologias de irrigação mais eficientes e sustentáveis, entre outras, que ajudem as plantas a lidar com períodos prolongados de seca, bem como para a seleção de genótipos que possam ser introduzidos em diferentes regiões do Brasil e do mundo, o que é essencial para aumentar a produtividade nacional e global (CAMARGO, 2010).

O melhoramento genético de *C. canephora* tem possibilitado a expansão de sua cultura para regiões com escassez de água (FERRÃO et al., 2012). O conilon apresenta grande variedade genética que permite sua adaptação ao déficit hídrico e a rápida recuperação do seu vigor após períodos de seca. Esta tolerância à seca está associada à sua capacidade de se aclimatar em ambientes desfavoráveis e produzir mesmo em condições de baixa umidade e temperaturas anormais (OLIVEIRA et al. 2018).

Estudos com diferentes clones de *C. canephora* selecionados como tolerantes ao déficit hídrico demonstraram que alguns apresentam produção relativamente elevada, mesmo em situações de seca (FERRÃO et al., 2000). Para manter o equilíbrio hídrico adequado, diversos fatores devem ser considerados, tais como o desenvolvimento de raízes profundas, o controle eficaz da transpiração, a manutenção da área foliar, a orientação vertical das folhas e a existência de um sistema antioxidante robusto, além da capacidade de exportar água e nutrientes (DAMATTA et al., 2000, DAMATTA et al., 2003; PINHEIRO et al., 2004; DAMATTA; RAMALHO, 2006; RONCHI; DAMATTA, 2007).

Investigações realizadas no Espírito Santo revelaram grande variabilidade genética entre clones de conilon quanto às respostas à seca (FERRÃO et al., 2012). Nestas condições, foi possível identificar clones sensíveis à seca, como o clone 109, que apresentou baixo vigor, desfolha significativa e queda na produtividade, bem

como clones que mantiveram bom vigor e produtividade praticamente inalterada (clone 120) (DAMATTA et al. 2003).

Entender os mecanismos moleculares que estão por trás da resposta da planta a situações de estresse hídrico é essencial para ampliação de conhecimentos, especialmente com o uso de técnicas moleculares (NAKASHIMA et al., 2014). O desenvolvimento e uso de ferramentas moleculares para avaliação das respostas do café à seca devem contribuir para o aumento de estudos sobre a fisiologia do mesmo e o desenvolvimento de técnicas de melhoramento, facilitando o lançamento de cultivares com desempenho superior sob condições ambientais adversas (FERRÃO et al., 2016).

As características bioquímicas desempenham também um papel importante na tolerância ao estresse hídrico, pois a manutenção da capacidade de transporte de fotoassimilados da parte aérea para as raízes leva ao crescimento radicular e, conseqüentemente, a um aumento na absorção de água. Por outro lado, clones sensíveis ao déficit hídrico apresentam um controle deficiente da transpiração, com os estômatos respondendo de forma limitada à redução da disponibilidade de água do solo, e também possuem uma baixa capacidade de absorção de água, com sistemas radiculares mais superficiais (RONCHI; DAMATTA, 2007).

Este estudo foi conduzido com a finalidade de identificar com base em características bioquímicas e na expressão relativa de genes com respostas diferenciais em situações de déficit hídrico, genótipos com características de tolerância ou suscetibilidade à seca para fins de melhoramento genético.

2. HIPÓTESE

A diminuição da disponibilidade de água no solo, agravada pelas alterações climáticas recentes, afeta diretamente o desenvolvimento do cafeeiro, prejudicando sua capacidade de produção e qualidade dos grãos. Tal fato tem gerado preocupação crescente na comunidade científica e na cadeia produtiva do café em relação ao desenvolvimento de genótipos com características de tolerância à seca.

Assim levantamos a hipótese de que a expressão diferencial de genes está envolvida na adoção de mecanismos de tolerância à seca no café e que associada a

alterações bioquímicas do metabolismo consistem em importantes parâmetros para a seleção de genótipos promissores quanto à tolerância ao déficit hídrico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas moleculares por meio da expressão diferencial dos genes *CcGoIS1*, *RBCS1* e *CcMPR1* e respostas bioquímicas em genótipos de *C. canephora* para entender melhor a capacidade de tolerância à seca.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a análise da expressão dos genes *CcMPR1*, *RBCS1* e *CcGoIS1*, a fim de se avaliar a possibilidade de respostas diferenciais nos diferentes genótipos em condição de déficit hídrico controlado;
- Avaliar e comparar as respostas de expressões gênicas diferenciais e respostas bioquímicas dos genótipos em diferentes períodos, com progressão do estresse e na fase de recuperação;
- Identificar indivíduos superiores para tolerância à seca dentro dos genótipos pré-selecionados.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. *Coffea canephora* – origem, distribuição e importância econômica

O cafeeiro (*Coffea* sp.) tem origem na África, sendo *Coffea arabica* originário da Etiópia e *Coffea canephora* do Congo. Atualmente, é cultivado na África Ocidental e Central, no Sudoeste Asiático e em algumas regiões das Américas, destacando-se o Brasil.

Os materiais genéticos da espécie *C. canephora* podem ser agrupados em dois tipos distintos, classificados pela sua região de origem e diretamente relacionados às duas variedades hoje presentes no mercado. Dentro desse grupo consta a

variedade "Robusta", pertencente ao grupo Congolense. Oriunda da África Central (República Centro-Africana, Congo e Camarões), caracteriza-se por cultivares que apresentam ótimo vigor, caule ereto e pouco ramificado, com folhas grandes e sistema radicular robusto. O grupo Guineano tem origem no oeste da África (Guiné e Costa do Marfim), compreendendo a variedade do tipo "Kouillou", conhecido no Brasil como conilon (FERRÃO et al., 2007). Os cultivares apresentam hábito de crescimento arbustivo, contendo folhas pequenas e caules que se ramificam facilmente. Além disso, os mesmos possuem controle estomático da transpiração mais eficiente, proporcionando uma maior tolerância a situações de seca (DAMATTA; RENA, 2001).

A espécie *C. canephora* é diplóide ($2n=2x=22$ cromossomos), alógama, apresentando autoincompatibilidade gametofítica impedindo autofecundação e cruzamento de indivíduos semelhantes o que explica sua grande diversidade (MORAES et al., 2018). De acordo com Ferrão et al. (2008) e Ivoglo et al. (2008), a reprodução natural favorece o surgimento de indivíduos altamente heterozigotos e populações com grande variabilidade genética. Essa variabilidade se reflete em diferentes características, tais como ciclos de maturação, produtividade, resistência a pragas e doenças, arquitetura, porte, tamanho e forma das sementes, frutos e folhas, bem como qualidade de bebida. No entanto, plantas com essas características tendem a ser menos produtivas, como mencionado por Partelli et al. (2021). Essas plantas se tornam matérias-primas ideais para programas de melhoramento, por possuírem variabilidade genética, o que favorece a seleção de genótipos superiores (DALCOMO et al., 2015).

C. canephora é amplamente distribuído, adaptando-se bem a regiões quentes e úmidas, assim como em áreas de floresta tropical de baixa altitude. No Brasil, é cultivado em locais com altitudes inferiores a 500 metros e temperaturas médias anuais entre 22 e 26°C (FERRÃO et al., 2007).

A produção de café conilon no país possui três segmentos distintos: exportação de grãos, industrialização para café solúvel, destinado principalmente ao mercado externo, e industrialização para torrado e moído, em misturas com café arábica, destinado para consumo interno (LIMA FILHO et al., 2015).

4.2. Respostas das plantas ao estresse abiótico

A natureza tem grande impacto no crescimento e na produtividade das plantas devido a uma variedade de fatores de estresses abióticos e bióticos. Alguns dos fatores abióticos que afetam negativamente as plantas são temperaturas excessivas; deficiência nutricional; falta de água; alto teor salino do solo; altas concentrações de radiação ultravioleta (UV), dióxido de enxofre (SO₂) e outros poluentes atmosféricos; deficiência de luz solar (baixa produtividade fotossintética) entre outros (ZHANG et al., 2022).

A resposta das plantas diante dos fatores abióticos estressantes pode ser dividida em três grandes grupos: o primeiro trata dos impactos sobre o desenvolvimento da planta com inibição da germinação e senescência precoce (MCKAY et al., 2003); o segundo se refere à biologia molecular, incluindo alteração na expressão gênica e redução na síntese protéica (MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013); o terceiro abrange as modificações fisiológicas, como diminuição do consumo de água, toxicidade metabólica e redução da taxa de fotossíntese. (KUMAR et al., 2021).

As condições ambientais às quais as plantas estão expostas podem impactar a síntese de metabólitos por meio da indução de respostas fisiológicas e adaptações relacionadas às alterações bioquímicas observadas em seus metabolismos. Nas plantas de café, essas mudanças podem ser importantes para a qualidade do grão (DELAROZA et al., 2014).

Por estarem naturalmente presentes nas folhas, os pigmentos fotossintéticos, clorofilas, carotenóides e seus derivados, podem ser analisados e utilizados como indicadores de estresse (OLIVEIRA et al., 2018b). O estresse das plantas é causado por uma variedade de fatores, geralmente diminuindo as concentrações de clorofila e aparentemente aumentando as de carotenóides e outros pigmentos (SCHOEFS, 2002).

Os fosfolipídios desempenham um papel fundamental na estrutura das membranas biológicas e têm grande importância em cascatas de sinalização em resposta a efeitos adversos em plantas submetidas a condições bióticas e abióticas. Em café, fosfolipases C exibiram efeitos transcricionais e bioquímicos distintos em resposta ao estresse por exposição ao alumínio, o que pode contribuir para as

respostas de sinalização de fosfolipídios desencadeadas por estresse de alumínio em suspensões de células (GONZÁLEZ-MENDOZA et al., 2019).

O estresse térmico causado pelas altas temperaturas ambientais consiste numa grande preocupação para a produção e qualidade das colheitas de café em todo o mundo. As plantas são frequentemente submetidas a estresse por calor, o que pode levar a uma desaceleração severa do crescimento e desenvolvimento podendo levar à morte (ZHAO et al., 2020). Extensas perdas agrícolas são atribuídas a distúrbios no crescimento causados pelo calor, o que torna ainda mais preocupante este cenário diante do fenômeno de aquecimento global (JAGADISH et al., 2021). O estresse térmico pode causar danos diretos às plantas, como desnaturação e agregação de proteínas, e aumento da fluidez dos lipídios da membrana (ZHAO et al., 2022). Também pode resultar em lesões indiretas, como a inativação de enzimas em cloroplastos e mitocôndrias, a inibição da biossíntese, aumento da degradação de proteínas, perda da integridade da membrana e alterações na parede celular da planta. Esses tipos de lesões eventualmente perturbam a homeostase celular e levam à redução do fluxo de íons, produção de compostos tóxicos e espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibição do crescimento das plantas (WAHID et al., 2007). A síntese de proteínas de choque térmico como a HSP70 corresponde a uma das primeiras respostas fisiológicas ao aumento da temperatura na planta, e contribui para preservar o funcionamento do fotossistema II (PSII) em temperaturas supra-ótimas (DIVYA et al., 2019).

Compreender a intrincada rede de respostas das plantas a situações de estresses abióticos fornecerá novos caminhos para a concepção de programas de melhoramento para gerar variedades de culturas mais resistentes a condições climáticas adversas com alto rendimento e maior qualidade do produto final.

4.3. Tolerância a seca em *Coffea canephora*

Entretanto, a disponibilidade hídrica é um grande fator limitador da produção mundial de café, devido à sensibilidade das espécies do gênero *Coffea* à seca e porque uma grande parcela desta se sustenta por meio dos agricultores familiares que geralmente não possuem recursos para estabelecer estruturas de irrigação (DAMATTA; RAMALHO, 2006). O agravamento de problemas relacionados à

limitação hídrica na produção de café é esperado com o avanço do aquecimento global. Projeta-se em todo cinturão produtor, uma temperatura média com aumento de cerca de 2,1°C prevista até 2050 (IPCC, 2014), o que pode resultar diretamente no aumento do déficit de vapor d'água, maior potencial evapotranspirativo e conseqüentemente no aumento da ocorrência de estresse hídrico nas plantas (DAVIS et al., 2012). Indiretamente, as modificações na temperatura média mundial também terão efeitos sobre a quantidade e distribuição da precipitação anual, podendo levar ao aumento na ocorrência de secas severas o que afetaria negativamente na produção (BUNN et al., 2015).

Em *Coffea*, o processo de fotossíntese é limitado quando ocorre estresse hídrico e altas temperaturas atmosféricas, devido ao fechamento dos estômatos e à redução das atividades fisiológicas da planta. Impactos mais graves são esperados em *C. arabica*, que é considerada mais sensível ao calor do que *C. canephora* (DAMATTA; RAMALHO, 2006), e estima-se que o aquecimento futuro promova a extinção de pelo menos 60% de todas as espécies de café (DAVIS et al., 2019), reforçando a necessidade de se encontrar ou desenvolver genótipos tolerantes à seca, explorando a diversidade natural nas populações selvagens de café como ferramentas de melhoramento genético (KIWUKA et al., 2023).

Condições ambientais severas desencadeiam uma ampla gama de respostas nas plantas, desde alterações na expressão gênica e no metabolismo celular até mudanças nas taxas de crescimento e produtividade das culturas (CAVATTE et al., 2012). A caracterização do estresse hídrico configura-se como fator importante na busca de um manejo racional da irrigação, visando tanto a preservação dos recursos hídricos, quanto a melhor resposta da planta ao estresse (PEREIRA et al., 2016).

As plantas submetidas a condições de baixa disponibilidade de água regulam seu status hídrico nos tecidos por meio de adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas que controlam a perda e aumentam a absorção de água (TOUNEKTI et al., 2018).

Vários estudos abordaram essas adaptações em diferentes espécies / cultivares de *Coffea*, o que inclui mudanças na eficiência e segurança hidráulica da planta, que consiste na relação entre a quantidade de água que uma planta perde através da transpiração e a quantidade de dióxido de carbono que absorve para realizar a fotossíntese. Ou seja, é a capacidade da planta em produzir matéria

orgânica por unidade de água consumida (PAIS et al., 2020; BRODRIBB et al., 2020), processos de osmorregulação (DAMATTA et al., 2003), produção e acúmulo de hormônios (MARRACCINI et al., 2012) e proteção contra estresse oxidativo (PINHEIRO et al., 2004; RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2013).

O conhecimento sobre a eficiência hidráulica configura-se como fator primordial que afeta o crescimento e a produtividade das plantas (PAIS et al., 2020; BRODRIBB et al., 2020). Em várias regiões de cultivo de café, a irrigação é utilizada com frequência para sustentar uma safra adequada. No entanto, os rendimentos podem ser ameaçados por um aumento da frequência e severidade da seca (MARTINS et al., 2019), com potenciais impactos negativos também na qualidade da bebida (DAMATTA et al., 2018). Além disso, *Coffea canephora* é tradicionalmente cultivado em regiões quentes e de baixa altitude, onde o déficit por pressão de vapor de água elevado é comum, o que é conhecido como seca atmosférica (LOBELL et al., 2014). Sob condições bem irrigadas, valores elevados de pressão de vapor do ar induziram modificações importantes na hidráulica da planta, resultando em desempenho diferente em mudas de Conilon contrastantes quanto à tolerância à seca (MACHADO FILHO et al., 2021).

Em geral, os clones de Conilon apresentam alta sensibilidade estomática à pressão de vapor do ar, mas aparentemente menos do que os cultivares de arábica (DAMATTA, 2004; DAMATTA; RAMALHO, 2006). Por outro lado, sob disponibilidade adequada de água ou curtos períodos de déficit hídrico, essa alta sensibilidade estomática pode ser desvantajosa. Nessas condições, maximizar a captação de CO₂ para a fotossíntese se tornaria mais importante do que reduzir a transpiração em termos de maximizar a produtividade (DAMATTA, 2003). A identificação de cultivares com características hidráulicas benéficas que conferem tolerância à seca pode melhorar o desempenho da cultura em regiões quentes e secas.

Uma das respostas imediatas das plantas sob estresse hídrico é o ajuste osmótico pela acumulação de osmólitos como carboidratos solúveis, proteínas, aminoácidos livres, glicina betaina e prolina (OZTURK et al., 2021). Osmoprotetores e osmólitos são pequenas moléculas, com carga elétrica neutra, não tóxicas em concentrações molares e protegem as membranas e proteínas contra o efeito desnaturante de condições de estresse abiótico (MAHMOOD et al. 2020). Além

disso, esses osmólitos acumulados em compartimentos citoplasmáticos são cruciais na preservação do turgor celular (RONTEIN et al. 2002).

Em algumas espécies, o acúmulo de prolina tem sido considerado uma adaptação à escassez de água que pode ser usada como um indicador para classificar genótipos com desempenho superior em condições de seca (DAMATTA; RAMALHO, 2006). No entanto, em cafeeiros, tal acúmulo não se correlaciona satisfatoriamente com a tolerância à seca em vários cultivares de arábica e robusta. De qualquer forma, o acúmulo desses compostos em condições de deficiência hídrica parece ser um indicador sensível do status hídrico da folha (CAVATTE et al., 2012).

As respostas fisiológicas do cafeeiro em situações de estresse são afetadas pelos níveis de CO₂ atmosférico, que têm sido amplamente discutidos no contexto do aquecimento global (RAMALHO et al., 2018a). Por meio de análise por impressão digital UV foi possível identificar que os níveis de CO₂ interferem na biossíntese dos principais metabólitos, ácidos clorogênicos, cafestol, e cafeína em resposta às condições ambientais estressantes. Maiores quantidades de ácidos clorogênicos foram observados em grãos de plantas não irrigadas cultivadas com enriquecimento de CO₂ e nas irrigadas no nível atual de CO₂ atmosférico (MARCHEFAVE et al., 2020).

Enquanto as folhas desempenham um papel primordial na fotossíntese, os sistemas radiculares desempenham inúmeras funções, incluindo suporte mecânico, absorção de nutrientes pela água e pelo solo, armazenamento de nutrientes e síntese de hormônios vegetais (CALLEJA-CABRERA et al., 2020; SCHNEIDER; LYNCH, 2020). Morfologia, anatomia e capacidade de absorção do sistema radicular são cruciais para determinar sua eficiência, enquanto o tamanho e a profundidade da raiz ditam o volume efetivo de solo que o sistema radicular pode explorar (BRODRIBB et al., 2015).

A arquitetura hidráulica da folha é um fator determinante da produtividade das plantas, bem como de suas respostas aos fatores de estresse ambiental (BRODRIBB et al., 2010; FLEXAS et al., 2018), sendo que as mesmas juntamente com o sistema radicular têm grande contribuição na resistência hidráulica da planta (SCOFFONI et al., 2017). O fluxo de água através desses órgãos envolve vias complexas que incluem vias do xilema, vias extra-xilema, e via transcelular

controlada em parte pela expressão e atividade de aquaporina e pela conectividade célula a célula (SCOFFONI et al., 2017; AVILA et al., 2020b). As características do xilema variam amplamente entre as espécies e genótipos, e podem afetar substancialmente o desempenho fotossintético, o crescimento e a produção. A economia de água da planta também é extremamente dependente da atividade das aquaporinas, que são proteínas intrínsecas da membrana que facilitam o transporte de água e outros pequenos solutos, incluindo CO₂, através das membranas celulares (LI et al. 2013). Aquaporinas identificadas em café podem desempenhar papéis importantes na resposta dessa espécie ao estresse hídrico (MINIUSI et al., 2015).

Outra característica gravemente comprometida em plantas submetidas à escassez hídrica é o equilíbrio homeostático. Em geral, a resposta à escassez de água se inicia com o aumento da produção endógena de ácido abscísico (ABA), que induz ao aumento da expressão de diversos genes relacionados a respostas a estresse e ativa uma cascata de sinalização que leva à redução da condutância estomática (gs) e, conseqüente redução nos níveis internos de CO₂ (OSAKABE et al., 2014), que afeta a atividade de carboxilação do ribulose-1,5-bisfosfato enzima carboxilase / oxigenase (Rubisco) (XU et al., 2013). A redução da atividade carboxilase altera os níveis de NADPH, que se acumula e gera aumento na concentração de elétrons. Esses elétrons são então doados para radicais superóxidos geradores de oxigênio molecular, que juntamente com outras espécies reativas de oxigênio, pode danificar o aparelho fotossintético da planta, bem como a peroxidação de membranas lipídicas e clorofilas (NISHIYAMA et al., 2011). Devido à baixa assimilação fotossintética, ocorre redução na síntese de sacarose e privação do fornecimento de açúcares solúveis para manutenção do metabolismo (HAMMOND; WHITE, 2008). Além disso, a sacarose pode ser hidrolisada para formar hexoses que serão alocadas em órgãos de reserva para posterior uso, o que pode acarretar o aumento do crescimento da raiz e maior absorção de água (XU et al., 2015).

Os hormônios desempenham um papel fundamental na adaptação das plantas a diversos estressores, sendo principais o ácido abscísico (ABA) e o etileno. O fechamento estomático, promovido pela redução do turgor das células-guarda em resposta a aumentos dos níveis foliares de ácido abscísico (ABA), representa uma

das primeiras respostas da planta limitando a perda excessiva de água (CREEK et al., 2020) e a assimilação de carbono pela fotossíntese durante a seca do solo (MARRACCINI et al., 2011). Além disso, dados recentes destacaram o papel do ABA na modulação do fechamento estomático em resposta a secas atmosféricas (aumento da pressão de vapor), tornando este fitohormônio um regulador chave dos movimentos estomáticos em angiospermas (CARDOSO et al., 2020).

O etileno é um hormônio gasoso que é sintetizado em taxas reduzidas em todos os tecidos das plantas e regula diversos aspectos do seu ciclo de vida, incluindo germinação de sementes, desenvolvimento da raiz, floração, maturação de frutos além de respostas a fatores abióticos e bióticos (ZHEFENG et al., 2009). No cafeeiro há uma conexão entre o etileno e a floração, de modo que esse hormônio atua como um indutor da abertura floral (LIMA, 2015). Estudos demonstram que o déficit hídrico pode provocar redução na produção de etileno dependendo do nível do estresse e que a reidratação pode provocar um rápido aumento na produção de etileno e no transporte de seu precursor ácido 1- carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) da raiz para a parte aérea (LIU et al., 2013; AVELAR, 2018).

Em condições de déficit hídrico moderado, as taxas fotossintéticas diminuem principalmente devido ao fechamento estomático. Conforme o estresse progride, as restrições bioquímicas podem limitar a fixação fotossintética de CO₂, o que leva à inativação das reações de transferência de elétrons gerando excesso de poder redutor na célula. Tal fato pode resultar na formação de radicais ativos de oxigênio (ROS), como radicais livres, superóxido e hidroxila, e também peróxido de hidrogênio, que podem gerar danos fotoinibitórios e fotooxidativos (LIMA et al., 2002). Proteção contra fotooxidação pode ser alcançada por um aumento na dissipação de excesso de energia de excitação por meio de carotenóides ou pelo aumento do metabolismo de ROS. Estes radicais estão envolvidos em praticamente todas as principais atividades metabólicas do indivíduo podendo gerar danos à membrana plasmática e aumento da peroxidação lipídica. As membranas de cloroplastos em café são consideradas particularmente sensíveis a estresse, sendo reconhecido o papel fundamental de ajustes em lipídios da membrana para o sucesso da aclimação em longo prazo (SCOTTI-CAMPOS et al., 2019).

As plantas possuem um sistema antioxidante complexo para lidar com ROS, composto por três classes gerais: (i) antioxidantes lipossolúveis associados à

membrana, como tocoferol e caroteno; (ii) moléculas antioxidantes pequenas e solúveis em água, como ascorbato e glutathione; e (iii) antioxidantes enzimáticos, incluindo as enzimas superóxido dismutases (SOD), que catalisam a reação de superóxido para H₂O₂, catalase (CAT), peroxidases do tipo guaiacol (EC) e enzimas do ciclo ascorbato-glutathione, como a ascorbato peroxidase (APX), que ajudam a desintoxicar a célula do H₂O₂ produzido (SHARMA et al., 2012).

Experimentos com mudas de *C. arabica* tratadas com selênio demonstraram que o metabolismo antioxidante foi eficaz na regulação do estresse oxidativo nas plantas tratadas. O aumento da sacarose e diminuição das atividades de SOD, CAT e ascorbato peroxidase, bem como a compartimentação do selênio nas raízes, foram os principais efeitos bioquímicos e fisiológicos moduladores das mudas de café em condições de estresse devido ao excesso de selênio (MATEUS et al., 2020).

Genótipos de *C. canephora* e *C. arabica* tolerantes à seca apresentam aparato antioxidante mais robusto o que acarreta menores perdas de folhas, melhor desempenho das atividades fotossintéticas e maior eficiência hídrica nas plantas após secas prolongadas (LIMA et al., 2002). Campos et al. (2019) demonstraram em estudos com plantas jovens de *C. arabica*, que em concentrações ideais, a melatonina promove aumento do sistema radicular e proteção do aparelho fotossintético, permitindo maior troca gasosa, maior eficiência de carboxilação e maiores teores de clorofila. Além disso, a melatonina melhorou a atividade dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e reduziu a peroxidação lipídica. Em situações de déficit hídrico prolongado o acúmulo de ROS supera a capacidade antioxidante da célula, gerando dano oxidativo ao aparato fotossintético que pode levar à morte celular.

Na contramão dos impactos relatados relacionados aos efeitos das mudanças climáticas, alguns estudos demonstram os efeitos benéficos do incremento de CO₂ atmosférico sobre os padrões de produtividade do cafeeiro por ampliar as taxas fotossintéticas da planta (DAMATTA et al., 2016), mitigando assim os impactos produzidos pela seca ou alta temperatura no cafeeiro (AVILA et al., 2020a), melhorando inclusive a qualidade do grão (RAMALHO et al., 2018a, b).

Estudos demonstraram que a concentração elevada de CO₂ reduziu o impacto do calor na fotossíntese do café, sendo os eventos relacionados à

membrana, como o transporte de elétrons nos fotossistemas PSI e PSII, muito menos afetados do que eventos bioquímicos como as atividades de enzimas (MARTINS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016). Este efeito desencadeou mecanismos de proteção que favoreceram o controle de ROS, e reduziu a fotoinibição do fotossistema (PS) II a 42° C. Além disso, fortaleceu a eficiência fotoquímica e o funcionamento bioquímico em todas as temperaturas, de 25 a 42° C (RODRIGUES et al., 2016), enquanto preservou a homeostase mineral (MARTINS et al., 2014) e qualidade do grão (RAMALHO et al., 2018a) em alta temperatura, contestando a ideia de que o café seja altamente sensível ao aquecimento (DAMATTA et al., 2019).

4.4. Base genética da tolerância à seca em *Coffea canephora*

Em nível genético, sabe-se que existe variabilidade dentro do gênero *Coffea* quanto à tolerância à seca (DAMATTA; RENA, 2001; LIMA et al., 2002; DAMATTA et al., 2003). Clones tolerantes à seca foram caracterizados como plantas vigorosas, com alta produtividade ao longo dos anos apresentando sistema de raízes mais profundas, melhor status hídrico dos tecidos associado à manutenção da área foliar (DAMATTA et al., 2003) à medida que a água do solo se torna limitante. Uma melhor compreensão dos mecanismos que permitem a aclimação das plantas à escassez de água e manutenção do crescimento e produção ajuda na seleção de genótipos mais aptos (PRAXEDES et al., 2006). Muitos destes mecanismos estão associados a genes que apresentam expressão diferencial entre clones / cultivares tolerantes e suscetíveis cultivados sob diferentes (com ou sem) condições de irrigação (MARRACCINI et al., 2012).

Os avanços recentes na genômica do café, principalmente projetos de sequenciamento com tag de sequência expressa (EST) abrem caminho para estudos envolvendo a genética da tolerância à seca e identificação de marcadores moleculares que poderiam ser usados para acelerar e aprimorar programas de melhoramento do café. Guedes et al.(2018) utilizando RNA-Seq investigaram as respostas à seca de clones sensíveis e tolerantes de *Coffea canephora* identificando 826 genes diferencialmente expressos (DEG) nos clones tolerantes e 135 nos sensíveis indicando que o clone sensível pode desencadear uma resposta ao

estresse oxidativo, possivelmente levando à morte celular programada, quando exposto a múltiplos episódios de seca. A aclimação de plantas tolerantes, por outro lado, parece envolver o metabolismo secundário antioxidante e a resposta ABA.

De acordo com seu nível de expressão, genes candidatos analisados em folhas de clones de *C. canephora* foram classificados em quatro tipos: (I) alta expressão sob irrigação independentemente dos clones analisados, mas baixa expressão sob limitação de água, como o *RBCS*; (II) maior expressão sob estresse hídrico, independentemente dos clones analisados, como manose 6-P redutase; (III) expressão gênica diferencial entre os clones tolerantes e sensíveis; e (IV) maior expressão em clones tolerantes do que sensíveis, como por exemplo, a cistatina (MARRACINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013).

Em estudo com cultivares de *C. arabica*, muitos genes candidatos envolvidos nas vias de transdução de sinal do estresse hídrico, e também na síntese de vários compostos bioquímicos, como açúcares, foram superexpressos no cultivar tolerante I59 sob a seca em comparação com cultivar Rubi que é suscetível. Foram também identificados vários genes candidatos que não apresentam qualquer semelhança com aqueles já depositados em bancos de dados globais, comumente chamados de "genes órfãos" o que postula que o surgimento destes é o resultado de respostas adaptativas específicas a cada espécie em função do estresse e das condições adversas enfrentadas por essas plantas durante o seu processo evolutivo (MARRACINI et al., 2013).

Sob limitação de água, *CcDREB1B*, *CcRAP2.4*, *CcERF027*, *CcDREB1D* e *CcTINY* foram os genes mais expressos principalmente em folhas de *C. canephora* tolerante à seca. Por outro lado, a expressão dos genes *CcERF016*, *CcRAP2.4* e *CcDREB2F* foi altamente regulada sob limitação de água nas raízes do clone 22 de *C. canephora* suscetível à seca (TORRES et al., 2019).

Diversos estudos analisaram os efeitos da seca na expressão gênica, sendo identificado um conjunto de genes diferencialmente expressos nas folhas de clones de *C. canephora* tolerantes e suscetíveis à seca (MARRACINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013) e em *C. arabica*, em condições de irrigação e de déficit hídrico (MOFATTO et al., 2016). Houve aumento da expressão de genes que codificam proteínas ricas em glicina, proteínas de choque térmico, desidrinas, ascorbato

peroxidase, bem como fatores de transcrição, como *DREB1D*, em condições de seca.

Marracini et al. (2012) identificou genes relacionados aos componentes centrais e moduladores da via de sinalização do ácido absísico, metabólitos secundários, fatores de transcrição, genes relacionados à fotossíntese e genes estruturais de resposta à seca, concluindo que uma rede complexa de respostas provavelmente envolvendo a via de sinalização ABA e do óxido nítrico pode envolver os principais determinantes moleculares que explicariam a melhor eficiência no controle do fechamento estomático e da transpiração exibido pelo clone 14 tolerante à seca de *C. canephora*.

Mofatto et al. (2016) analisaram o perfil de genes expressos em ápices caulinares plagiotrópicos e folhas de dois cultivares de *C. arabica* tolerante (IAPAR59) e suscetível (Rubi) à seca. As diferenças de disponibilidade hídrica entre as plantas afetaram genes específicos como os envolvidos na biossíntese do ácido abscísico, desenvolvimento vegetal e metabolismo lipídico, sendo identificados diversos genes candidatos potencialmente envolvidos no determinismo genético de tolerância à seca.

Os genes *CaMYB1*, *CaERF017*, *CaEDR2*, *CaNCED*, *CaAPX1*, *CaAPX5*, *CaGoIS3*, *CaDHN1* e *CaPYL8a* foram suprarregulados nas progênes de café arábica com maior eficiência fotoquímica sob déficit hídrico, contribuindo, portanto, para a eficiência da fotossíntese em progênes tolerantes à seca (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2021).

Além dos fatores de transcrição (TFs) e small RNAs não codificantes, a memória transcricional parece atuar na modulação da expressão gênica durante a resposta à seca das plantas.

Alves-Ferreira et al. (2012) identificaram que a superexpressão do gene HB12 de *Coffea arabica* (*CaHB12*), que é regulado positivamente sob seca, melhora a tolerância de *Arabidopsis thaliana* aos estresses de seca e salinidade. Estudo com variedades de algodão transgênico demonstrou que a superexpressão de *CaHB12* pode prevenir a abscisão foliar nas plantas sob ou após estresse abiótico (BASSO et al., 2021).

Os genes escolhidos para este trabalho estão diretamente relacionados a diferentes mecanismos adotados pelo cafeeiro em resposta a situações de estresse hídrico. O gene *CcMPP1* codifica a enzima manose 6-fosfato redutase (M6PR) que atua na biossíntese de manitol e possui importante papel nos mecanismos osmorreguladores ativados em resposta à seca, apresentando aumento de expressão nestas condições (MARRACCINI et al., 2012). O gene *RBCS1* codifica para a subunidade menor da RUBISCO, sendo que sua expressão tende a ser reduzida em condições de déficit hídrico devido às alterações nos processos fotossintéticos (MARRACCINI et al., 2011). O gene *CcGolS1* está relacionado à síntese de oligossacarídeos derivados da rafinose, como galactinol, sendo que seus níveis de expressão tendem a aumentar em resposta à seca devido à adoção de mecanismos osmorreguladores (DOS SANTOS et al., 2015).

4.5. Referências Bibliográficas

- ALVES-FERREIRA, M.; DA CRUZ WALTENBERG, F. P.; DE CAMPOS PINTO, E. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Use of the coffee homeobox gene *CaHB12* to produce transgenic plants with greater tolerance to water scarcity and salt stress. **Patent**. US20130340113A1. 2012.
- AVILA, R.T., CARDOSO, A.A., DE ALMEIDA, W.L., COSTA, L.C., MACHADO, K.L.G., BARBOSA, M.L., Coffee plants respond to drought and elevated [CO₂] through changes in stomatal function, plant hydraulic conductance, and aquaporin expression. **Environmental and Experimental Botany**, v. 177, p. 104–148, 2020a.
- AVILA, R.T., DE ALMEIDA, W.L., COSTA, L.C., MACHADO, K.L.G., BARBOSA, M.L., DE SOUZA, R.P. B. Elevated air [CO₂] improves photosynthetic performance and alters biomass accumulation and partitioning in drought-stressed coffee plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 177, p. 104-137, 2020b.
- BASSO, M. F., COSTA, J. A., RIBEIRO, T. P., ARRAES, F. B. M., LOURENÇO-TESSUTTI, I. T., MACEDO, A. F., GROSSI-DE-SA, M. F. (2021). Overexpression of the *CaHB12* transcription factor in cotton (*Gossypium hirsutum*) improves drought tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 165, p. 80-93, 2021.
- BILEN, C.; EL CHAMI, D.; MEREU, V.; TRABUCCO, A.; MARRAS, S.; SPANO, D. A Systematic Review on the Impacts of Climate Change on Coffee Agrosystems. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 102, 2023.
- BRODRIBB, T. J.; FEILD, T. S.; SACK, L. Viewing leaf structure and evolution from a hydraulic perspective. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 488-498, 2010.

- BRODRIBB, T. J.; HOLLOWAY-PHILLIPS, M.-M.; BRAMLEY, H. Improving Water Transport for Carbon Gain in Crops. 2nd ed. In: SADRAS, V. O.; P. CALDERINI, D. F. B. T. C. (Eds.). **Academic Press**, San Diego, 2015. pp. 251-281.
- BRODRIBB, T. J.; POWERS, J.; COCHARD, H.; CHOAT, B. Hanging by a thread? Forests and drought. **Science**, v. 368, p. 261-266, 2020.
- BUNN, C.; LÄDERACH, P.; OVALLE RIVERA, O.; KIRSCHKE, D. A bitter cup: Climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. **Climatic Change**, v.129, n.1-2, p.89-101, 2015.
- CALLEJA-CABRERA, J., BOTER, M., ONATE-SANCHEZ, L., PERNAS, M. Root growth adaptation to climate change in crops. **Frontiers in Plant Science**, v.11, p.544, 2020.
- CAMARGO, M.B.P. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. **Bragantia**, v.69, n.1, p.239-247, 2010.
- CAMPOS, C. N., ÁVILA, R. G., DE SOUZA, K. R. D., AZEVEDO, L. M.; ALVES, J. D. Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young *Coffea arabica* L. plants. **Agricultural Water Management**, v.211, p.37-47, 2019.
- CARDOSO, A.A., BRODRIBB, T.J., KANE, C., DAMATTA, F..M., MCADAM, S.A.M. Osmotic adjustment and hormonal regulation of stomatal responses to vapor pressure deficit in sunflower. **AoB Plants**, v. 12, n. 4, 2020.
- 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, n. 2, p. 111-122, 2012.
- CONAB. Compêndio de Estudos Conab / Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de caféV. 5 - SAFRA 2018 - N.1 - Primeiro levantamento | janeiro, p. 1-45, 2018.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento Safra Brasileira de Café, v. 5– Safra 2019, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-61, maio, 2019.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de café, Brasília, DF, v. 10, n. 1, jan. 2023
- CREEK, D.; LAMARQUE, L. J.; TORRES-RUIZ, J. M.; PARISE, C.; BURLETT, R.; TISSUE, D. T.; DELZON, S. Xylem embolism in leaves does not occur with open stomata: Evidence from direct observations using the optical visualization technique. **Journal of Experimental Botany**. v. 71, p. 1151–1159, 2020.
- 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.

DAMATTA, F. M.; SILVEIRA, J. S. M.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M. E. Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas, MG. Anais... Brasília: **Embrapa Café**, p. 907-910, 2000.

DAMATTA, F. M.; RENA, A. B. Tolerância do café à seca. In: Zambolin, L. (Ed.), Tecnologias de Produção de Café com Qualidade. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp. 65–100, 2001.

DAMATTA, F. M. Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. **Life science advances. Plant physiology**. v.5, p.227–265, 2003.

DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; PINHEIRO, H. A.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**. v.164, p.111–117, 2003.

DAMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**. v.86, p.99–114, 2004.

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

DAMATTA, F.M.; GODOY, A.G.; MENEZES-SILVA, P.E.; MARTINS, S.C.; SANGLARD, L.M.; MORAIS, L.E.; 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, n.1, p.341-352, 2016.

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.

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, n. 1, p. 167-178, 2019.

DAVIS, A. P.; GOLE, T. W.; BAENA, S.; MOAT, J. The impact of climate change on indigenous arabica coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e47981, 2012.

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, p. eaav3473, 2019.

DAVIS, A.P.; GARGIULO, R.; FAY, M.F.; SARMU, D.; HAGGAR, J. Lost and Found: *Coffea stenophylla* and *C. affinis*, the Forgotten Coffee Crop Species of West Africa. **Frontiers in Plant Science**. v. 11, p. 616, 2020.

DE OLIVEIRA SANTOS, M.; COELHO, L. S.; CARVALHO, G. R. et al. Photochemical efficiency correlated with candidate gene expression promote coffee drought tolerance. **Scientific Reports**, v. 11, p. 7436, 2021.

DELARROZA, F.; RAKOCEVIC, M.; MALTA, G.B.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1929-1938, 2014.

DIVYA, K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K.; REDDY, O. S. Heat shock proteins (Hsps) mediated signalling pathways during abiotic stress conditions. **Plant Signaling & Behavior**, v. 14, n. 4, p. 499-516, 2019.

FERRÃO, Romário Gava et al. Avaliação de clones de café conilon no Estado do Espírito Santo. 2000.

FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; BRAGANÇA, S.M.; FERRÃO, M.A.G.; MUNER, L.H. *Café Conilon*. Vitória: **Incaper**, 702p. 2007.

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.

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S.; DE MUNER, L. H.; LANI, J. A.; PREZOTTI, L. C.; VENTURA, J. A.; MARTINS, D. S.; MAURI, A. L.; MARQUES, E. M. G.; ZUCATELLI, F. *Café Conilon: técnicas de produção com variedades melhoradas*. 4. ed. revisada e ampliada. Vitória, ES: **Incaper**: Circular Técnica, p. 74, 2012.

FERRÃO, Romário Gava et al. Genética e melhoramento: desenvolvimento e recomendação de cultivares com tolerância à seca para o Espírito Santo. **Incaper em Revista**, v. 6, n. 4, p. 51-71, 2016.

FLEXAS, J.; CARRIQUÍ, M.; NADAL, M. Gas exchange and hydraulics during drought in crops: who drives whom? **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 3791–3795, 2018.

GONZÁLEZ-MENDOZA, V.M.; SÁNCHEZ-SANDOVAL, M.E.; MUNNIK, T.; HERNÁNDEZ-SOTOMAYORA, S.M.T. Biochemical characterization of phospholipases C from *Coffea arabica* in response to aluminium stress. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 64, n. 110951, 2019.

GUEDES, F. A. DE F.; NOBRES, P.; RODRIGUES FERREIRA, D. C.; MENEZES-SILVA, P. E.; RIBEIRO-ALVES, M.; CORREA, R. L.; ALVES-FERREIRA, M. Transcriptional memory contributes to drought tolerance in coffee (*Coffea canephora*) plants. **Environmental and Experimental Botany**, [S.l.], v. 147, p. 220–233, 2018.

HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 1, p. 93–109, 2008.

IPCC. Working group II fact sheet, climate change 2014: Impacts, adaptation, and vulnerability. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*, 5, 2014.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. Working group III. Mitigation of Climate Change. p. 99, 2014. In: PARTELLI, F. L.; BONOMO, R. Café Conilon: o clima e manejo da planta. Alegre, ES: CAUFES, 2016.

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 progênes de café 9 robusta. **Bragantia**, v. 67, n. 4, p. 823-831, 2008.

JAGADISH, S. V. K.; WAY, D. A.; SHARKEY, T. D. Plant heat stress: Concepts directing future research. **Plant Cell Environment**, v. 44, n. 7, p. 1992-2005, 2021.

KIWUKA, C.; VOS, J.; DOUMA, J.C.; MUSOLI, P.; MULUMBA, J.W.; PONCET, V.; ANTEN, N.P.R. Intraspecific variation in growth response to drought stress across geographic locations and genetic groups in *Coffea canephora*. **Ecology and Evolution**. 13, p. 1-17, 2023.

KUMAR, M.; KUMAR PATEL, M.; KUMAR, N.; BAJPAI, A. B.; SIDDIQUE, K. H. M. Metabolomics and Molecular Approaches Reveal Drought Stress Tolerance in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9108, 2021.

LI, S.X.; WANG, Z.H.; STEWART, B.A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate. **Advances in Agronomy**, v. 118, p. 205–397, 2013.

LIMA, A. A. (2015). Ethylene regulation under different watering conditions and its possible involvement in coffee (*Coffea arabica* L.) flowering. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, p. 151.

LIMA, A. L. S.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A.; 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, n. 3, p. 239–247, 2002.

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.

LIU, D. et al. . An organ-specific role for ethylene in rose petal expansion during dehydration and rehydration. **Journal of Experimental Botany**. p. 2333–2344, 2013.

LOBELL, D.B., ROBERTS, M.J., SCHLENKER, W., BRAUN, N., LITTLE, B.B., REJESUS, R.M., et al. (2014). Greater sensitivity to drought accompanies maize yield increase in the U.S. Midwest. **Science** 344, 516–519.

LORANTY, A.; REMBIAŁKOWSKA, E.; ROSA, E.A.S.; BENNETT, R.N., 2010. Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 23, p. 432-441, 2010.

MACHADO FILHO, J.A.; RODRIGUES, W.P.; BARONI, D.F.; PIREDA, S.; CAMPBELL, G.; DE SOUZA, G.A.R.; CAMPOSTRINI, E. Linking root and stem hydraulic traits to leaf physiological parameters in *Coffea canephora* clones with contrasting drought tolerance. **Journal of Plant Physiology**, n. 153355, p. 258-259, 2021.

MAHMOOD, T.; ABDULLAH, M.; AHMAR, S.; YASIR, M.; IQBAL, M.S.; YASIR, M.; REHMAN, S.; AHMED, S.; RANA, R.M.; GHAFOR, A. Incredible role of osmotic adjustment in grain yield sustainability under water scarcity conditions in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plants**, [S.l.], v. 9, p. Article number 1208, 2020.

MARCHEFAVE, G.G.; PAULI, E.D.; TORMENA, C.D.; ORTIZ, M.C.V.; DE ALMEIDA, A.G.; RAKOCEVIC, M.; SCARMINIO, I.S. Factorial design fingerprint discrimination of *Coffea arabica* beans under elevated carbon dioxide and limited water conditions. **Talanta**. v. 209, 120591, 2020.

MARRACCINI, P.; FREIRE, L.P.; ALVES, G.S.; VIEIRA, N.G.; VINECKY, F.; ELBELT, S.; RAMOS, H.J.O.; MONTAGNON, C.; VIEIRA, L.G.E.; LEROY, T.; POT, D.; SILVA, V.A.; RODRIGUES, G.C.; ANDRADE, A.C.P. RBCS1 expression in coffee: *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 85, p. 1-23, 2011.

MARRACCINI, P.; VINECKY, F.; ALVES G.S.C.; RAMOS, H.J.O.; ELBELT, S.; VIEIRA, N.G.; CARNEIRO, F.A.; SUJII, P.S.; ALEKCEVETCH, J.C.; SILVA, V.A.; DAMATTA, F.M.; FERRÃO, M.A.G.; LEROY, T.; POT, D.; VIEIRA, L.G.E.; SILVA, F.R.; ANDRADE, A.C. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**. v. 63, p. 4191–212, 2012.

MARRACCINI, P.; VIEIRA, N.G.K.; DUARTE, E.; AQUINO, S.O.; CARNEIRO, F.A.; COSTA, T.S.; SUJII, P.S.; VINECKY, F.; ALEKCEVETCH, J.C.; ALVES, G.S.C.; LEROY, T.; DE BELLIS, F.; FERRÃO, M.A.G.; DAMATTA, F.M.; POT, D.; SILVA, V.A.; RODRIGUES, G.C.; ANDRADE, A.C. (2013). Molecular responses of coffee plants to drought stress. Workshop on Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants: the Challenge for the 21st Century.

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, p. 365–379, 2014.

MARTINS, S.C.V.; SANGLARD, M.L.; MORAIS, L.E.; MENEZES-SILVA, P.E.; MAURI, R.; AVILA, R.T. How do coffee trees deal with severe natural droughts? An analysis of hydraulic, diffusive and biochemical components at the leaf level. **Trees - Structure and Function** v. 33, p. 1679–1693, 2019.

MATEUS, M.P.B.; TAVANTI, R.F.R.; GALINDO, F.S.; SILVA, A.C.R.; GOUVEIA, G.C.C.; APARECIDO, C.F.F.; REIS, A.R. *Coffea arabica* seedlings genotypes are tolerant to high induced selenium stress: Evidence from physiological plant responses and antioxidative performance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, 111016, 2020.

MCKAY, J.K.; RICHARDS, J.H.; MITCHELL-OLDS, T. Genetics of drought adaptation in *Arabidopsis thaliana*: I. Pleiotropy contributes to genetic correlations among ecological traits. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 1137–1151, 2003.

MINIUSSI, M.; DEL TERRA, L.; SAVI, T.; PALLAVICINI, A.; NARDINI, A. Aquaporins in *Coffea arabica* L.: Identification, expression, and impacts on plant water relations and hydraulics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 95, p. 92–102, 2015.

MOFATTO, L.S.; CARNEIRO, F.A.; VIEIRA, N.G.; DUARTE, K.E.; VIDAL, R.E.; ALEKCEVETCH, J.C.; COTTA, M.G.; VERDEIL, J.; LAPEYRE-MONTES, F.; LARTAUD, M.; LEROY, T.; BELLIS, F.; POT, D.; RODRIGUES, G.C.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA1, G.A.G.; ANDRADE, A.C.; MARRACCINI, P. Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars. **BMC Plant Biology**. v. 16, p. 94, 2016.

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.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-S.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**. v.5, p. 170, 2014.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; MURATA, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Physiologia Plantarum**. v. 142 n. (1), p.35–46, 2011.

OLIVEIRA, L.N.L.; ROCHA, R.B.; FERREIRA, F.M.; VICTOR MOUZINHO SPINELLI, V.M.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L. Selection of *Coffea canephora* parents from the botanical varieties Conilon and Robusta for the production of intervarietal hybrids. **Ciência Rural**, v. 48, p.1–7, 2018a.

OLIVEIRA, W.J.; SOUZA, E.R.; SANTOS, H.R.B.; FRANÇA E SILVA, E.F.F.; DUARTE, H.H.F.; MELO, D.V.M. Fluorescência Da Clorofila Como Indicador De Estresse Salino Em Feijão Caupi. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v.12, n.3, p. 2592 - 2603, 2018b.

OSAKABE, Y.; OSAKABE, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L.S.P. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science** v. 5, p. 86, 2014.

OZTURK, M.; TURKYILMAZ UNAL, B.; GARCÍA-CAPARRÓS, P.; KHURSHEED, A.; GUL, A.; HASANUZZAMAN, M. Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. **Physiologia Plantarum**. v. 172, n. (2), p. 1321-1335, 2021.

PAIS, I.P.; REBOREDO, F.H.; RAMALHO, J.C.; PESSOA, M.F.; LIDON, F.C.; SILVA, M.M. Potential impacts of climate change on agriculture - A review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. v. 32, 2020.

PARTELLI, F.L.; Oliosi, G.; Dalazen, J.R.; da Silva, C.A.; Vieira, H.D.; Espindula, M.C. Proportion of ripe fruit weight and volume to green coffee: Differences in 43 genotypes of *Coffea canephora*. **Agronomy Journal**, v.113, n.2, p.1050-1057, 2021.

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.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; FONTES, E. P. B.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, v. 167, p. 1307-1314, 2004.

PRAXEDES, S.C.; DAMATTA, F.M.; LOUREIRO, M.E.; FERRÃO, M.A.G.; CORDEIRO, A.T. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, n. (3), p. 263–273, 2006.

RAMALHO, J.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; GUERRA, M.; REBOREDO, F.H.; MÁGUAS, C.M. Can elevated air [CO₂] conditions mitigate the predicted warming impact on the quality of coffee bean? **Frontiers in Plant Science**. v. 9, p. 1–14, 2018a.

RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; LIDON, F.C.; MARQUES, L.M.C.; LEITAO, A.E.; FORTUNATO, A. S. Stress cross-response of the antioxidative system promoted by superimposed drought and cold conditions in *Coffea* spp. **PLoS One** v. 13, 2018b.

RODRIGUES, W.P.; MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.S.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; COSTA, M.C.S.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; COLWELL, F.; GOULAO, L.; AGUAS, C.M.; MAIA, R.; PARTELLI, F.; CAMPOSTRIN I, F.; SCOTTICAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.; 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.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, N. F.; CAVATTE, P. C.; SILVA, P. E.; MARTINS, S. C.; MORAIS, L. E.; MEDINA, E. F.; DAMATTA, F. M. Physiological and biochemical abilities of robusta coffee leaves for acclimation to cope with temporal changes in light availability. **Physiologia plantarum**, v. 149, n. (1), p.45-55, 2013.

RONCHI, C. P.; DAMATTA, F. M. Aspectos fisiológicos do café conilon. In: FERRÃO, G. F. et al. (Orgs.). *Café Conilon*. Vitória: Incaper, p. 94-119, 2007.

RONTEIN, D.; DIEUAIDE-NOUBHANI, M.; DUFOURC, E.J.; RAYMOND, P.; ROLIN, D. The metabolic architecture of plant cells stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. (46), p. 43948-43960, 2002.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends Food Science and Technology**. 13, p. 361-371, 2002.

SCHNEIDER, H.M.; LYNCH, J.P. Should root plasticity be a crop breeding target? **Frontiers in Plant Science**. v. 11, p. 546, 2020.

SCOFFONI, C.; ALBUQUERQUE, C.; BRODERSEN, C.R.; TOWNES, S.V.; JOHN, G.P.; BARTLETT, M.K.; BUCKLEY, T.N. Outside-xylem vulnerability, not xylem embolism, controls leaf hydraulic decline during dehydration. **Plant Physiology**. v. 173, p. 1197–1210, 2017.

SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; MARTINS, L.D.; TOMAZ, M.A.; RODRIGUES, W.P.; RAMALHO, J.C. Lipid profile adjustments may contribute to warming acclimation and to heat impact mitigation by elevated [CO₂] in *Coffea* spp. **Environmental and Experimental Botany**, v. 167. p. 103856, 2019.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**. v.26, 2012.

TORRES, L.F.; REICHEL, T.; DÉCHAMP, E.; DE AQUINO, S.O.; DUARTE, K. E.; ALVES, G.S.C.; MARRACCINI, P. Expression of DREB-Like Genes in *Coffea canephora* and *C. arabica* Subjected to Various Types of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology**. v. 12, p. 98-116, 2019.

TOUNEKTI, T.; MAHDHI, M.; AL-TURKI, T.A.; KHEMIRA, H. Water relations and photoprotection mechanisms during drought stress in four coffee (*Coffea arabica*) cultivars from southwestern Saudi Arabia. **South African Journal of Botany**. v. 117, p. 17–25, 2018.

VIEIRA, N.G.; CARNEIRO, F.A.; SUJII, P.S.; ALEKCEVETCH, J.C.; FREIRE, L.P.; VINECKY F. Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. **Tropical Plant Biology**. v. 6, p. 181–90, 2013.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, n. (3), p. 199-223, 2007.

XU, L.; YU, J.; HAN, L.; HUANG, B. Photosynthetic enzyme activities and gene expression associated with drought tolerance and post-drought recovery in Kentucky bluegrass. **Environmental and Experimental Botany**. v. 89, p. 28–35, 2013.

XU, W.; CUI, K.H.; XU, A.H.; NIE, L.X.; HUANG, J.L.; PENG, S.B. Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 37, n. (2), p. 9, 2015.

ZHANG, H.; ZHU, J.; GONG, Z.; ZHU, J.K. Abiotic stress responses in plants. **Nature Reviews Genetics** v. 23, n. (2), p.104-119, 2022.

ZHAO, J, LU, Z, WANG, L, JIN, B. Plant Responses to Heat Stress: Physiology, Transcription, Noncoding RNAs, and Epigenetics. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. (1), p. 117, 2020.

ZHAO, C.; NAWAZ, G.; CAO, Q.; XU, T. Melatonin is a potential target for improving horticultural crop resistance to abiotic stress. **Scientia Horticulturae**, v. 291 110560, 2022.

ZHEFENG, L.; SILIN, Z.; DON, G. Recent advances in ethylene research, **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3311–3336, 2009.

5. Capítulo 1: Perfil de Expressão Diferencial de Genes Envolvidos nas Respostas de *Coffea canephora* em Diferentes Condições Hídricas

RESUMO

Com a previsão das mudanças climáticas diversas pesquisas genéticas têm permitido a identificação de variedades de café mais resistentes à seca e capazes de crescer em locais sob condições adversas. Desta forma, a seleção de índices e parâmetros adequados pode facilitar a identificação de materiais genéticos superiores com maiores potenciais para resistir a condições de déficit hídrico. Assim, objetivou-se com este trabalho realizar a análise da expressão dos genes *CcMPR1*, *RBCS1* e *CcGoIS1*, a fim de se avaliar a possibilidade de respostas diferenciais nos diferentes genótipos em condição de déficit hídrico controlado, visando compreender a influência destes genes no mecanismo de tolerância à seca do cafeeiro, no intuito de selecioná-los como possíveis marcadores de estresse. De acordo com as análises de expressão gênica realizadas é possível observar que os genes *CcMPR1*, *RBCS1* e *CcGoIS1* apresentaram expressão diferencial nas distintas condições de déficit a que os genótipos foram submetidos, mostrando também que a maior parte dos genótipos conseguiu se recuperar após reidratação. *CcMPR1* apresentou potencial uso como marcador de estresse, além de indicar a adoção de estratégias de defesa em café por meio de mecanismos osmorreguladores sendo que os clones 120, 6T, 1T, P50, P40, 7T, P2 e 4S foram os mais promissores. Com relação à expressão *RBCS1* os genótipos 3T, P6 e 1T se destacaram ao apresentarem perfis de recuperação semelhantes ao observado no genótipo tolerante. A expressão de *GoIS1* nas diferentes condições experimentais demonstrou que na maior parte dos genótipos estudados não ocorreram variações significativas nas condições irrigadas. O potencial uso dos genes testados traz perspectivas de investigações futuras relacionadas à análise dos componentes integrantes das distintas vias metabólicas, as quais os respectivos genes estão associados, a fim de caracterizar mecanismos fisiológicos adotados em resposta à seca.

Palavras-chave: *CcMPR1*; *RBCS1*; *CcGoIS1*.

5.1. INTRODUÇÃO

O café é uma das commodities agrícolas mais importantes do mundo. Seu cultivo, processamento, transporte e comercialização geram empregos para milhões de pessoas em todo o planeta, com destaque para o Brasil, maior produtor e exportador da bebida (RAMALHO et al., 2018).

A demanda pelo produto vem aumentando constantemente, mas essa cultura pode ser ameaçada em várias regiões pelas mudanças climáticas, principalmente no que diz respeito à seca e às temperaturas desfavoráveis, que são os principais determinantes climáticos para a adequação das áreas de cultivo podendo afetar significativamente tanto as quantidades, como a qualidade do produto gerado (DAMATTA; RAMALHO 2006; DOS SANTOS et al., 2011).

Avanços na pesquisa genética permitiram a identificação de variedades de café mais resistentes à seca, e capazes de crescer em locais sob condições mais adversas. Essas variedades são capazes de produzir grãos de alta qualidade em ambientes com menos água, o que permite a expansão da cultura do café para novas regiões que antes eram consideradas inadequadas para o cultivo (FERRÃO et al., 2012).

A tolerância à seca do cafeeiro está associada à sua capacidade de se aclimatar em ambientes desfavoráveis e produzir mesmo em condições de baixa umidade e temperaturas anormais (OLIVEIRA et al. 2018). Contudo, a seleção de índices e parâmetros adequados pode facilitar a identificação de materiais genéticos superiores com maiores potenciais para resistir a condições de déficit hídrico (DAMATTA; RAMALHO, 2006). Assim, objetivou-se com este trabalho realizar a análise da expressão dos genes *CcMPP1*, *RBCS1* e *CcGoIS1*, a fim de se avaliar a possibilidade de respostas diferenciais nos diferentes genótipos em condição de déficit hídrico controlado, visando compreender a influência destes genes no mecanismo de tolerância à seca do cafeeiro, no intuito de selecioná-los como possíveis marcadores de estresse.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Material genético

Os materiais genéticos utilizados neste trabalho foram obtidos e cedidos pelo programa de Melhoramento de de *C. canephora* do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), cultivados na Fazenda Experimental de Marilândia (FEM), localizada no município de Marilândia, região Noroeste do Estado do Espírito Santo.

Foram avaliados 14 genótipos de café conilon, 3 pré-selecionados como tolerantes (3T, P6 e 7T) e 3 como suscetíveis (P2, P4 e P10) da população 120x109, 3 pré-selecionados como tolerantes (1T, 6T e P50) e 3 como suscetíveis (P40, P44, e P59) da população 109x120 e os genótipos parentais 120 e 109 (SOUZA-SOBREIRA et al., 2017). O genótipo 120 é caracterizado como de porte médio, maturação média, suscetível à ferrugem, vigoroso e tolerante à seca; e o genótipo 109, como de porte médio, maturação média, suscetível à ferrugem e à seca. As plantas foram preparadas no campo (FEM) para produção brotações e ramos para serem utilizadas na produção de mudas clonais por estaquia.

5.2.2. Experimento de Avaliação de progênies em condições de estresse hídrico

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal do Espírito Santo, campus de Alegre no delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, 14 tratamentos (6 progênies do cruzamento 120 x 109, 06 progênies do cruzamento 109 x 120 e os dois genitores) e 2 fatoriais (Irrigado e não irrigado), divididos em 3 blocos, totalizando 84 plantas experimentais.

5.2.3. Condições experimentais e avaliação da quantidade de água no experimento

As plantas foram cultivadas em vasos de 18 litros para os ensaios em casa de vegetação. Ao atingirem cerca de 10 meses de idade, foram estabelecidos 2 regimes hídricos (irrigado e limitação hídrica). O solo foi mantido na capacidade de campo antes de se instalar a imposição do déficit hídrico para todas as 84 plantas e o tratamento controle irrigado foi mantido na capacidade de campo no decorrer do

experimento. Os demais vasos foram submetidos ao déficit hídrico por meio da limitação da irrigação, aplicando-se 75% de água no tratamento com déficit hídrico em relação ao tratamento controle irrigado. Importante destacar que a limitação da irrigação foi realizada de forma lenta e gradual, de forma distinta ao realizado em muitos trabalhos envolvendo déficit hídrico, como por exemplo, o realizado por Marracini et al (2012). De 14 em 14 dias a irrigação do tratamento com déficit hídrico foi limitada respectivamente em 25%, 40%, 55% e 70% com relação ao tratamento controle irrigado. O estado da água nas folhas foi avaliado por meio da determinação do potencial de pressão (ψ_t) utilizando-se Câmara de Scholander em todas os momentos de análise realizados. A partir do momento em que as plantas atingiram o potencial hídrico característico de déficit hídrico severo (-3,0 MPA), elas voltaram a receber a irrigação de capacidade de campo do solo, sendo que esta etapa foi denominada de Recuperação.

5.2.4. Experimento Molecular

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES). As coletas do material genético foram realizadas a partir de folhas saudáveis, jovens e completamente expandidas dos experimentos conduzidos em condição de déficit hídrico e sem déficit hídrico. Foram utilizadas 3 repetições biológicas, totalizando 84 plantas em cada etapa de coleta. As coletas ocorreram em quatro etapas, na etapa anterior à implantação do estresse hídrico, nos controles irrigados, quando as plantas atingiram o estágio de déficit hídrico moderado (ψ_t -1,5 MPA), déficit hídrico severo (ψ_t -3,00 MPA) e na fase de recuperação. As amostras foliares coletadas foram acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a -80°C.

5.2.4.1. Extração de RNA total

O RNA total foi isolado de folhas dos genótipos de conilon utilizando o método *Purelink*. Para a extração do RNA total de cada amostra em cada uma das etapas de coleta, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido usando almofariz e pistilo. Posteriormente, foram submetidas ao método de extração de *RNA Purelink Plant RNA*[®] (Invitrogen) realizado de acordo com especificações do fabricante.

A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose (2%) contendo tampão TBE 1x e corado com solução de brometo de etídio. A concentração e pureza do RNA foi determinada em espectrofotômetro *NanoDrop* 2000/2000c® (Thermo Scientific).

5.2.4.2. Síntese de cDNA

Com o objetivo de eliminar o DNA contaminante, foi realizado o tratamento com DNase I (1 µg para qRT-PCR), numa reação contendo os seguintes reagentes: 0,5 U de DNase I (*RQ1 RNase-Free DNase®*; Promega); tampão de reação 1X, completando com água estéril tratada com DEPC (dietil-pirocarbonato) para o volume final de 10 µL. Depois, se procedeu à incubação a 37 °C por 45 min. A inativação da DNase ocorreu mediante a adição de solução de parada (*RQ1 DNase Stop Solution®*; Promega) e incubação a 65 °C por 10 min. Neste ponto, a solução pode ser armazenada a -80 °C sendo posteriormente utilizada para a síntese da primeira fita de cDNA.

Para a síntese da primeira fita do cDNA foi utilizado 1 µg de RNA total previamente tratado com DNase utilizando o sistema de transcrição reversa *GoScript®* (Promega) com oligo (dT15) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a adição de Oligo-dT, a solução de reação foi incubada a 70 °C por 5 min. Uma mistura contendo dNTPs, tampões e a enzima *GoScript® Reverse Transcriptase* foi adicionada a essa solução e o anelamento foi feito a 25 °C por 5 min. A extensão final ocorreu a 42 °C por uma hora, seguida de inativação da enzima a 70 °C por 15 min. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

5.2.4.3. Análises de expressões gênicas por meio de qPCR

As análises de expressão gênica, por meio da PCR quantitativa em tempo real (qPCR), foram realizadas em triplicatas técnicas e biológicas de acordo com o MIQE – Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (BUSTIN et al. 2009, BUSTIN et al. 2013).

Os ensaios de qPCR em tempo real foram realizados com os cDNA de fita simples sintetizados e com base na metodologia descrita pelo fabricante (Promega).

A qPCR foi realizada com 3 μ L de cDNA numa diluição de 40 vezes e concentração final de 0,2 mM de cada iniciador num volume final de 10 μ L com *SYBR/qPCR MasterMix, GoTaq[®]* (Promega). Foram utilizados para a quantificação relativa os *primers* correspondentes ao gene de controle interno Ubiquitina. A amplificação foi realizada utilizando o seguinte perfil de temperatura: 2 min de desnaturação inicial a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15s e 60 °C durante 1 min. As seqüências dos *primers* utilizados estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Sequências de *primers* utilizados nas análises de expressão gênica.

Nome do gene	Sigla	Sequência Primer Foward	Sequência Primer Reverse	Autor
Manose 6-fosfato redutase	<i>CcMPR1</i>	AATCAGCAATTACAGCGTTTTGC	AGTGACACAGATGCCGTGCTT	Marracini et al., 2012
Rubisco	<i>RBCS1</i>	CCGTCCTCTTCCCCTCAAAT	CTGAAAGTACAGCCCCAGTTC	Marracini et al., 2011
Galactinol sintase	<i>CcGolS1</i>	CACAGGGTTGCATTGTTTCGT	CGGAGCTTGGGAATAATTGATGAC	Dos Santos et al., 2015
Ubiquitina	<i>CcUBQ10</i>	AAGACAGCTTCAACAGAGTACAGCAT	GGCAGGACCTTGGCTGACTATA	Marracini et al., 2012

Os dados foram analisados usando o software *LightCycler[®] 96 SW 1.1* (Roche) para determinar os valores do limite do ciclo (Ct). A especificidade dos produtos de PCR gerados para cada conjunto de *primers* foi verificada pela análise do Tm (dissociação) dos produtos amplificados. Os níveis de expressão gênica foram normalizados para o nível de expressão da ubiquitina (*CcUBQ10*) como referência constitutiva (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009). A expressão foi expressa como quantificação relativa aplicando a fórmula $(1+E)^{-\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = \text{gene } Ct_{\text{alvo}} - \text{gene } Ct_{\text{referência}}$. (MARRACCINI et al., 2012).

5.2.5. Análises estatísticas

Os dados das análises moleculares foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando um fatorial duplo (14 genótipos x 3 condições de estresse hídrico) com as médias sendo comparadas pelo teste de Tukey. Para comparar cada tratamento (condições de estresse hídrico) com o controle irrigado foi realizado o teste de Dunnett. As análises estatísticas foram realizadas através dos pacotes ExpDes.pt e Tratamento.addo *software* R Studio versão 4.1.0 (R CORE TEAM, 2021). Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% de probabilidade.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Expressão do gene *CcMPP1*

O gene *CcMPP1* codifica a enzima manose 6-fosfato redutase (M6PR) que atua na biossíntese de manitol e possui importante papel nos mecanismos osmorreguladores ativados em resposta à seca, apresentando aumento de expressão nestas condições (MARRACCINI et al., 2012).

A análise da expressão do gene *CcMPP1* demonstrou o aumento pronunciado dos níveis de expressão em todos os genótipos utilizados nas condições de déficit moderado e severo, e redução da expressão durante a fase de reidratação pós estresse (recuperação), onde se observou níveis semelhantes aos obtidos nos respectivos controles irrigados (Figura 1).

Na condição de déficit moderado ocorreram diferenças significativas entre os genótipos, sendo que os genótipos 120 (13,4) e 4S (11,4) apresentaram as maiores médias, seguidos pelos genótipos P2 (10,9), P40 (10,3), P50 (9,9) e 1T (9,6). Já o genótipo 109 (2,7) apresentou a menor média. O maior nível de expressão no genótipo 120 era esperado por se tratar de genótipo caracterizado como tolerante à seca, assim como o menor nível apresentado pelo genótipo 109, que é caracterizado como suscetível (RONCHI; DAMATTA, 2007). Como os demais genótipos foram obtidos por meio de cruzamentos recíprocos utilizando os clones 120 e 109 como parentais, é esperado que haja diferenças significativas entre os mesmos nas respostas ao estresse, e que em alguns genótipos que apresentem características semelhantes ao pai tolerante, ocorra aumento nos níveis de expressão de *CcMPP1* nas condições de déficit. Na condição de déficit severo as maiores médias foram observadas nos genótipos P6 (10,2), P59 (9,1) e 3T (7,8), indicando que estes genótipos responderam de forma mais tardia ao estresse sofrido, visto que os níveis de expressão no estresse severo foram superiores aos obtidos no déficit moderado (Tabela 1).

Tabela 1. Média da expressão relativa do gene *CcMPR1* em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.

Tratamentos	Genótipos													
	120	109	3T	P6	7T	P2	4S	P10	1T	6T	P50	P40	44S	P59
Déficit Moderado	13.4A	2.7F	4.9DEF	5.0DEF	6.0D	10.9BC	11.4A	2.7EF	9.6BC	8.9C	9.9BC	10.3BC	5.1D	3.9DEF
Déficit Severo	5.6CDEF	5.1DEF	7.8ABC	10.2A	4.5EF	6.8BCDE	4.9DEF	3.5FG	1.7G	5.3DEF	1.4G	7.3BCD	6.7BCDE	9.1A
Recuperação	2.3A	1.9A	1.3A	1.6A	0.14A	0.10A	0.5A	0.6A	1.9A	0.09A	0.24A	2.1A	0.23A	0.51A
Controle Irrigado	0.52	0.44	0.17	0.59	0.17	0.85	0.60	0.45	0.19	0.11	0.58	0.23	0.78	1.24

Médias seguidas pela mesma letra na linha correspondente não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na condição de déficit moderado todos os genótipos apresentaram aumento significativo nos níveis de expressão em relação aos controles irrigados, indicando que este gene é um bom marcador de estresse hídrico. Os genótipos 120 (13,4), 4S (11,4), P2 (10,9), P40 (10,3), P50 (9,9), 1T (9,6) e 6T (8,9) apresentaram os maiores níveis de expressão, enquanto o genótipo 109 (2,67) apresentou o menor valor de expressão. Quando em déficit severo, os genótipos P6 (10,2), P59 (9,1), 3T (7,8) e P40 (7,3) tiveram os maiores níveis de expressão em oposição ao genótipo P50 (1,4) que apresentou o menor valor. O genótipo 1T foi o único a não apresentar diferença significativa em relação ao controle irrigado neste nível de estresse (Figura 1). Resultados semelhantes foram observados por De Carvalho et al. (2014), onde os níveis de expressão do gene para M6PR (manose-6-fosfato redutase) foram significativamente aumentados na condição de déficit hídrico em *C. canephora*.

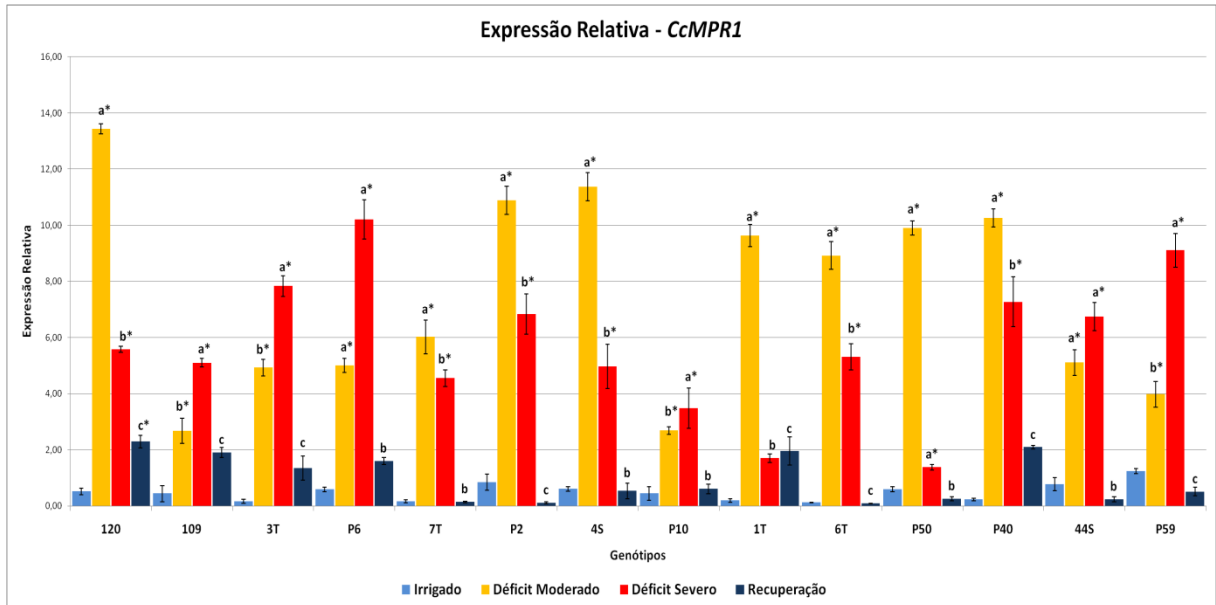


Figura 1. Expressão relativa do gene *CcMPP1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno em diferentes estágios de déficit hídrico. Genótipos com a mesma letra em relação às diferentes condições de déficit não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre níveis de estresse (moderado, severo e recuperação) em relação ao Controle Irrigado pelo Teste de Dunnet a 5% de probabilidade. Valores são a média de 3 repetições, barras representam o erro padrão da média.

A via metabólica da M6PR está presente em diversas espécies de plantas, incluindo *Arabidopsis thaliana* (SICKLER et al., 2007), trigo (ABEBE et al., 2003), *C. arabica* (FREIRE et al., 2013; DE CARVALHO et al., 2014), e *C. canephora* (VINECKY, 2009; MARRACINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). A expressão aumentada do gene *CcMPP1* pode estar relacionada à regulação da biossíntese de manitol e à ativação dos mecanismos osmorregulatórios que ajudam a proteger as células vegetais da desidratação e do estresse oxidativo.

O manitol é um importante osmolito em plantas, que ajuda a manter a homeostase osmótica celular. Acredita-se que a ativação da via de biossíntese de manitol em resposta à seca ajuda a manter a turgescência celular e a evitar o dano oxidativo e a morte celular. A enzima M6PR é responsável por catalisar a primeira etapa na biossíntese do manitol, convertendo manose-6-fosfato em manitol-1-fosfato (VIEIRA et al., 2013).

Estudos com conilon mostraram que a expressão do gene *CcMPP1* que codifica a M6PR é aumentada durante o estresse hídrico, indicando que a produção de manitol consiste numa resposta adaptativa à escassez de água em café

(VINECKY, 2009; MARRACINI et al., 2012). Tais observações estão de acordo com os nossos resultados, visto que todos os genótipos testados apresentaram aumento significativo da expressão de *CcMPR1* tanto no déficit moderado, quanto no déficit severo, quando comparados aos genótipos irrigados.

Tal mecanismo de proteção está relacionado à osmorregulação que é um processo fisiológico complexo que permite às plantas lidar com o estresse hídrico, através da regulação dos níveis de solutos e da manutenção do equilíbrio osmótico da célula, sendo um processo essencial para a sobrevivência das plantas em ambientes sujeitos a períodos de seca ou baixa disponibilidade de água (GILL et al., 2022).

Alguns estudos sugerem que a ativação de vias de sinalização de estresse pode levar ao aumento da expressão do gene MPR1. Em particular, o ácido abscísico (ABA), um hormônio de estresse amplamente conhecido, tem sido implicado na regulação positiva da expressão do gene MPR1 em resposta à seca. O ABA é sintetizado em resposta à seca e ativa uma cascata de sinalização que pode levar à ativação de fatores de transcrição que se ligam ao promotor do gene MPR1 e aumentam sua expressão.

Além disso, outras moléculas sinalizadoras, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), também podem desempenhar um papel na regulação da expressão do gene MPR1 em resposta à seca. O H₂O₂ é um sinal importante de estresse oxidativo que pode ser produzido em plantas em resposta à seca. Esse sinal pode ativar fatores de transcrição que, por sua vez, aumentam a expressão do gene MPR1 (SILVA et al., 2022).

Vinecky (2009), relata que em *C. canephora* a expressão diferencial de *CcMPR1* pode indicar teores mais altos de manitol em folhas de café estressado pela seca, onde poderia atuar como osmoprotetores, estando associados à tolerância à seca (PATONNIER et al., 1999), o que é observado quando comparamos os perfis de expressão de *CcMPR1* nos genótipos 120 e 109, caracterizados como contrastantes em relação à tolerância à seca em conilon (RONCHI; DAMATTA, 2007).

O genótipo 120 (tolerante) demonstra uma resposta mais imediata à diminuição do teor de água no solo, acionando mecanismos de resposta osmorreguladoras nas condições iniciais de déficit demonstrado pelo expressivo aumento de *CcMPR1*

durante o estresse moderado (Figura 2). Ocorre então uma diminuição dos níveis de expressão do gene na condição de déficit severo, indicando que os mecanismos adotados pela planta, ou seja, a síntese de manitol, atuaram no sentido de equilibrar os processos fisiológicos nas plantas, que então restabeleceram seus padrões de expressão durante a recuperação, a níveis semelhantes aos observados na condição irrigada. No entanto, o genótipo 109 (suscetível), apesar de conseguir se recuperar bem ao estresse sofrido parece responder de forma mais lenta à escassez de água, visto que é observado aumento mais expressivo de expressão de *CcMPR1* na condição de déficit severo (Figura 2).

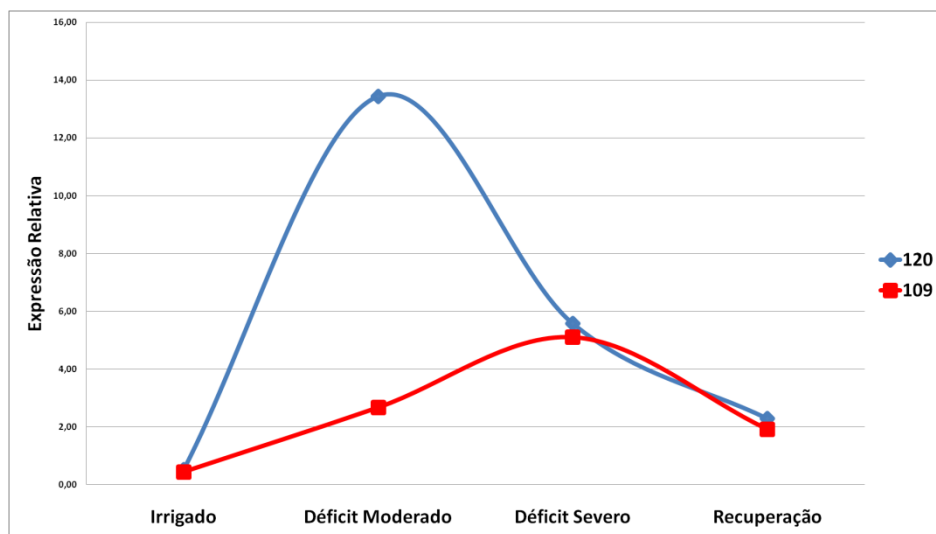


Figura 2. Expressão relativa do gene *CcMPR1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno nos genótipos 120 e 109 no controle irrigado e nas condições de déficit hídrico moderado, severo e recuperação.

Estes dados estão de acordo com o exposto por Freire et al. (2013), que utilizando cultivares de café contrastantes quanto à tolerância à seca observaram aumento da expressão do gene *MPR1* na condição de estresse moderado em genótipos tolerantes, o que poderia estar associado ao maior potencial adaptativo destes indivíduos.

Marraccini et al. (2012) também demonstraram que nos genótipos tolerantes, entre eles o genótipo 120 há significativo aumento de expressão do gene *CcMPR1* na condição de déficit hídrico juntamente com o aumento de outros genes fortemente relacionados com atividades osmorreguladoras e antioxidantes no café.

Com base no perfil de expressão relativa visualizado nos genótipos 120 e 109, é possível comparar os perfis de expressão dos demais genótipos de conilon pesquisados. Assim, observa-se que os genótipos 7T, P2, 4S, 1T, 6T, P50, P40 apresentaram padrão de expressão de *CcMPR1* característico de uma resposta mais imediata ao déficit semelhante ao observado no genótipo tolerante 120 (Figura 3A), o que indicaria que estes genótipos seriam mais promissores com relação à resposta à seca. Os genótipos 3T, P6, P10, 44S e P59, no entanto, apresentam um padrão de expressão de acordo com o apresentado pelo genótipo 109, com superexpressão do gene *CcMPR1* na condição de estresse severo (Figura 3B).

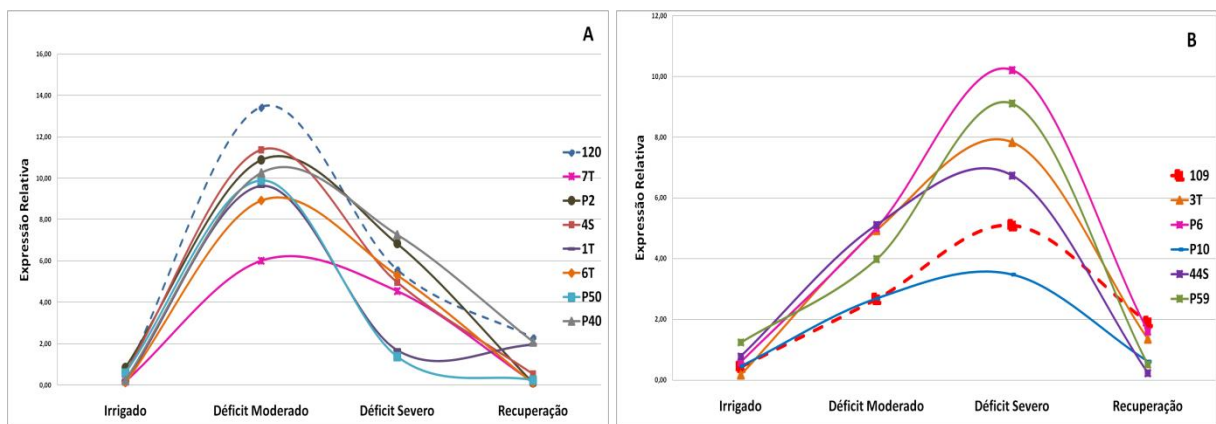


Figura 3. Comparação da expressão relativa do gene *CcMPR1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno nos diferentes genótipos no controle irrigado e nas condições de déficit hídrico moderado, severo e recuperação. A. Genótipos com perfis de expressão semelhantes ao genótipo tolerante 120 (azul tracejado). B. Genótipos com perfis de expressão semelhantes ao genótipo susceptível 109 (vermelho tracejado).

Diante o exposto, nossos resultados indicam a expressão diferencial de *MPR1* em situações de déficit hídrico podendo apresentar potencial uso como marcador de estresse, indicando a adoção de resposta osmorreguladora como estratégia de defesa em café. Os genótipos 6T, 1T, P50, P40, 7T, P2 e 4S se mostraram mais promissores em relação à resposta à seca com perfil de expressão semelhante ao genótipo 120 que é considerado como tolerante à seca, em função das análises morfofisiológicas observadas em diversos estudos (LIMA et al., 2002; MARRACCINI et al., 2012). Damatta; Ramalho (2006) demonstraram aumento nas atividades antioxidantes e osmorreguladoras no clone 120, o que seria um dos fatores responsáveis por maior tolerância à seca. Cabe destacar que os genótipos P6, 1T,

P50, 3T, 7T foram previamente caracterizados como possivelmente tolerantes em experimento em campo, de acordo com características morfofisiológicas conforme descrito por Souza-Sobreira, (2017). Os dados da expressão de *CcMPR1* apresentados reforçam portanto, a existência de potencial para tolerância à seca nos referidos genótipos.

5.3.2. Expressão do gene *RBCS1*

O gene *RBCS1* codifica para a subunidade menor da RUBISCO, sendo que sua expressão tende a ser reduzida em condições de déficit hídrico devido às alterações nos processos fotossintéticos (MARRACCINI et al., 2011). A expressão do gene *RBCS1* é reduzida em condições de déficit hídrico devido à resposta adaptativa das plantas à falta de água. Durante o déficit hídrico, as plantas precisam reduzir a perda de água por transpiração e ajustar seu metabolismo para preservar a água disponível. A redução na expressão do gene *RBCS1*, que codifica para a proteína da rubisco, é uma das respostas adaptativas das plantas à falta de água.

A rubisco é uma enzima chave no processo de fixação de carbono durante a fotossíntese, e sua expressão é regulada por fatores ambientais, como a disponibilidade de água. Durante o déficit hídrico, a redução na expressão do gene *RBCS1* resulta em uma diminuição na quantidade de rubisco produzida pelas plantas. Isso ajuda a reduzir a taxa de fotossíntese e, portanto, a perda de água por transpiração. A redução na expressão do gene *RBCS1* também ajuda a realocar recursos dentro da planta para outras vias metabólicas que são necessárias durante o estresse hídrico, como a síntese de solutos osmóticos (MARRACCINI et al., 2012).

A análise da expressão do gene *RBCS1* apresentou diferenças significativas na comparação entre os genótipos estudados nos diferentes níveis de estresse. Na condição de déficit moderado os genótipos 120 (11,62), 3T (10,41), P40 (13,4) e P50 (12,73) apresentaram as maiores médias, e os genótipos P10 (1,92) e 109 (3,8) apresentaram as menores médias. Na condição de déficit severo as maiores médias foram observadas nos genótipos 120 (8,93), 4S (7,78), 7T (6,33) e 3T (6,2), e a menor média no genótipo 109 (0,86) (Tabela 2).

Tabela 2. Média da expressão relativa do gene *RBCS1* em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.

Tratamentos	Genótipos													
	120	109	3T	P6	7T	P2	4S	P10	1T	6T	P50	P40	44S	P59
Déficit Moderado	11.6AB	3.8GH	10.41BC	7.45DE	8.21CD	5.65EFG	5.76EFG	1.92H	4.47FG	5.8EFG	12.7A	13.4A	6.3DEF	4.15F
Déficit Severo	8.93A	0.86F	6.20BC	4.54CD	6.33BC	2.23EF	7.78AB	2.8DEF	3.22DE	1.89EF	2.7DEF	2.8DEF	3.79DE	4.1CDE
Recuperação	25.37A	8.44G	18.49B	16.79B	11.04EF	5.58H	8.83FG	13.85D	19.04B	7.63GH	11.22E	18.53B	2.77I	15.6CD
Controle Irrigado	17.10	12.67	13.98	17.52	14.1	14.87	17.16	11.89	12.22	11.42	14.81	12.15	14.30	15.08

Médias seguidas pela mesma letra na linha correspondente não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O estresse hídrico pode afetar diretamente a fotossíntese, por meio de alterações no metabolismo da planta ou por limitar a quantidade de CO₂ disponível para fixação. Embora o fechamento estomático geralmente ocorra em resposta à exposição à seca, em alguns casos a fotossíntese pode ser mais controlada pela capacidade de fixar CO₂ do que pelo aumento à resistência à difusão (DAMATTA et al., 2003). Neste processo destaca-se a atuação da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), uma enzima crucial no processo de fotossíntese, com papel fundamental na fixação do carbono. A RUBISCO também tem um papel no processo de aclimação ao estresse oxidativo por meio da fotorrespiração, processo que pode proteger o aparelho fotossintético contra a fotoinibição, mantendo a cadeia transportadora de elétrons ativa, limitando assim o acúmulo de elétrons e formação de ROS. Tal característica poderia explicar o fato de que em plantas de café submetidas a déficit hídrico, não foram observados danos associados a efeitos fotoinibitórios (LIMA et al., 2002; PINHEIRO et al., 2004).

O gene *RBCS1* codifica a subunidade menor da RUBISCO, e em muitas espécies a sua expressão pode ser considerada um importante marcador de estresse hídrico apresentando maior nível de expressão gênica em plantas irrigadas e a redução da expressão em situações de estresses abióticos que interfiram nos mecanismos fotossintéticos, como a seca (MARRACCINI et al., 2012). Marraccini et al. (2011) observaram que a seca reduziu drasticamente a expressão foliar de *RBCS1* em *C. canephora* e *C. arabica* cultivadas em casa de vegetação e condição de campo, respectivamente. Tal perfil está de acordo com o apresentado em nossos experimentos, que demonstraram redução na expressão do gene *RBCS1* em todos

os genótipos avaliados tanto na condição de déficit moderado quanto no déficit severo, ocorrendo aumento da expressão somente na condição de recuperação (Figura 4), o que também foi observado por Marraccini et al. (2011).

Os genótipos 120, 3T, P40 e P50 apresentaram os maiores níveis de expressão do gene RBCS1 na condição de déficit moderado. Isso pode ser explicado pelo fato de que essas plantas possuem mecanismos adaptativos para lidar com o estresse hídrico, o que lhes permite manter a fotossíntese mesmo em condições de restrição hídrica. Esses mecanismos podem incluir, por exemplo, a capacidade de fechar os estômatos para reduzir a perda de água por transpiração ou a produção de compostos que ajudam a proteger a planta contra os efeitos do estresse hídrico.

O genótipo P40 apresentou aumento de expressão na condição de déficit em comparação com o controle irrigado. Isso sugere que essas plantas possuem mecanismos mais eficientes de utilização da água, o que pode ser uma vantagem em ambientes com escassez de água.

Por outro lado, os genótipos P10 e P59 apresentaram um perfil de expressão diferente dos demais genótipos, com maior nível de expressão na condição de déficit severo. Isso pode indicar que esses genótipos possuem mecanismos diferentes para lidar com o estresse hídrico, como a capacidade de produzir solutos osmóticos que ajudam a manter o equilíbrio hídrico da planta ou a capacidade de reparar danos causados pelo estresse hídrico de forma mais eficiente do que os demais genótipos (Figura 4).

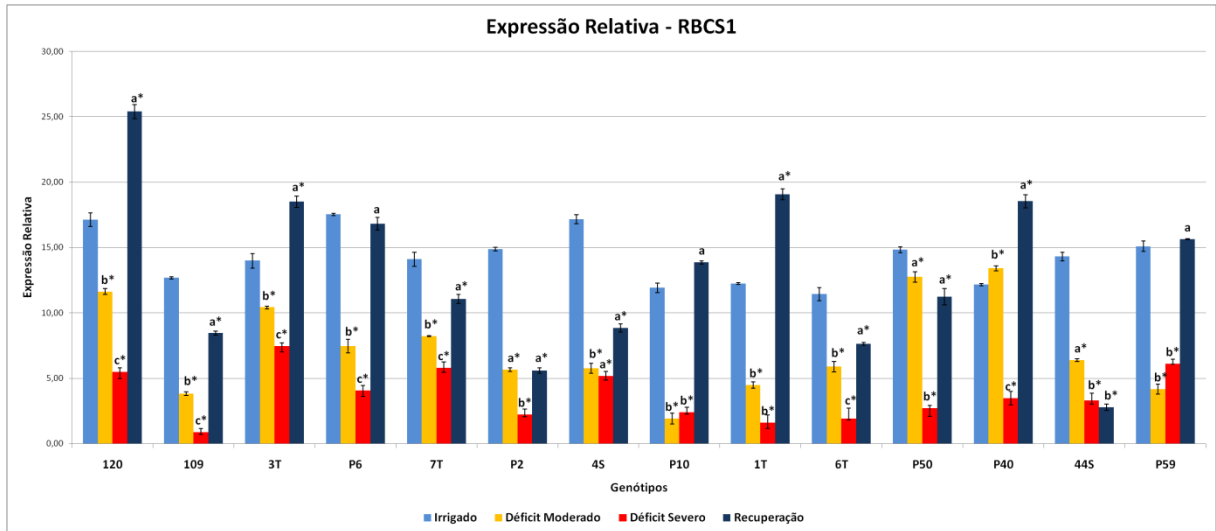


Figura 4. Expressão relativa do gene *RBCS1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno em diferentes estágios de déficit hídrico. Genótipos com a mesma letra em relação às diferentes condições de déficit não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre níveis de estresse (moderado, severo e recuperação) em relação ao Controle Irrigado pelo Teste de Dunnet a 5% de probabilidade. Valores são a média de 3 repetições, barras representam o erro padrão da média.

Os genótipos 109, P2, 6T, P50 e 44S apresentaram perfil de expressão diferente dos demais genótipos no sentido de que os níveis de expressão gênica na condição de recuperação foram inferiores aos controles irrigados, o que contrasta com o observado em vários trabalhos que utilizaram o gene *RBCS* como marcador de estresse devido à redução no seu padrão de expressão em situações de seca, seguido por aumento dos níveis pós reidratação (SICHER; BARNABY, 2012; PARK *et al.*, 2013; CHUNG *et al.*, 2016; ZHUANG *et al.*, 2020).

É importante destacar que a expressão do gene *RBCS* é apenas uma das várias respostas moleculares que podem ocorrer em plantas submetidas ao estresse hídrico. Portanto, outros genes e proteínas podem estar envolvidos nessa resposta e podem explicar as diferenças observadas entre os genótipos em estudos anteriores e neste estudo, sendo necessárias novas pesquisas para investigar mais profundamente as respostas moleculares desses genótipos ao estresse hídrico e à reidratação.

Marraccini *et al.* (2012) avaliaram a expressão diferencial do gene *RBCS1* em genótipos de *C. canephora* tolerantes e sensíveis à seca demonstrando redução da expressão na condição de déficit hídrico, mas com perfis distintos a depender das características do genótipo avaliado. Tais observações estão de acordo com a

comparação dos perfis de expressão observados para o genótipo 120 tolerante e o 109 susceptível (Figura 5).

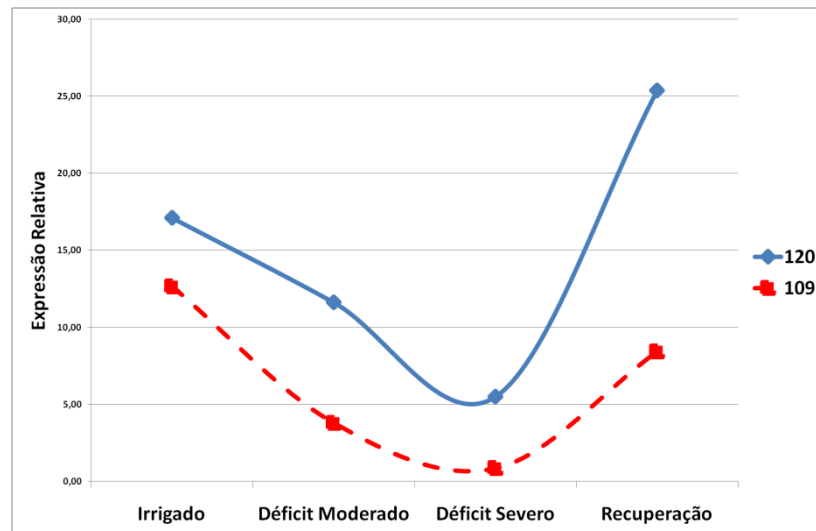


Figura 5. Expressão relativa do gene *RBCS1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno nos genótipos 120 e 109 no controle irrigado e nas condições de déficit hídrico moderado, severo e recuperação.

Ambos os genótipos apresentam redução da expressão de *RBCS1* nas condições de déficit moderado e severo, seguido por aumento da expressão na condição de recuperação, no entanto pode-se observar que os níveis de expressão relativa são maiores para o genótipo 120 tolerante em todas as condições de déficit avaliadas, indicando que as respostas ao déficit seriam mais eficientes nestes genótipos.

Desta forma, os genótipos 3T, P6 e 1T apresentaram perfil de expressão mais semelhante ao genótipo tolerante, caracterizado por maiores níveis de expressão relativa do gene *RBCS1* nas condições de déficit e níveis maiores que o controle irrigado na condição de recuperação (Figura 6A). Já os genótipos 7T, P2, 4S e 6T tiveram um perfil mais próximo ao genótipo 109, com níveis de expressão na recuperação inferiores aos controles irrigados (Figura 6B).

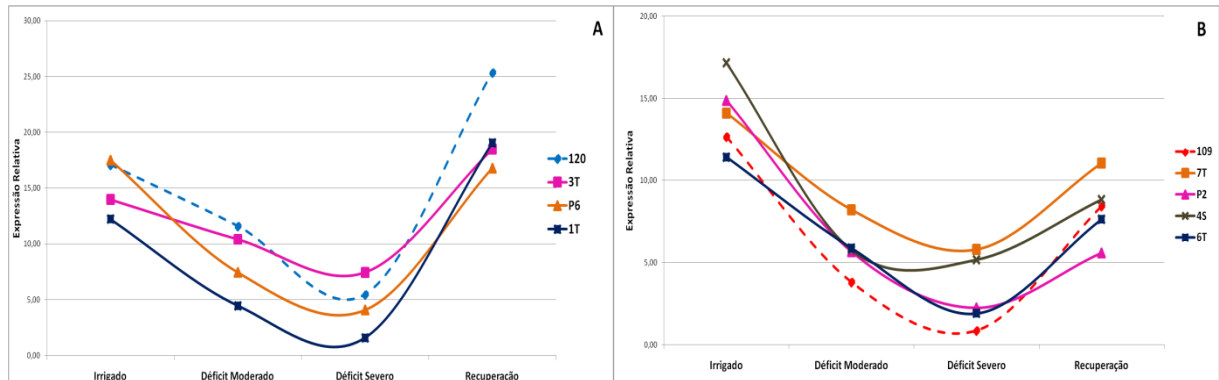


Figura 6. Comparação da expressão relativa do gene *RBCS1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno nos diferentes genótipos no controle irrigado e nas condições de déficit hídrico moderado, severo e recuperação. A. Genótipos com perfis de expressão semelhantes ao genótipo tolerante 120 (azul tracejado). B. Genótipos com perfis de expressão semelhantes ao genótipo susceptível 109 (vermelho tracejado).

Diante dos dados apresentados é possível indicar o potencial uso do gene *RBCS1* como marcador de estresse em *C. canephora*, visto que o mesmo apresentou expressão diferencial e significativa nas distintas condições de déficit hídrico a que os genótipos foram expostos. Além disso, demonstrou-se que os genótipos 3T, P6 e 1T se mostraram mais promissores em relação a tolerarem o estresse sofrido, possivelmente por meio de alterações menos significantes nas taxas fotossintéticas e pela adoção de mecanismos antioxidantes, visualizadas pela rápida recuperação da expressão quando novamente hidratados, o que pode indicar maior capacidade de resposta à seca.

5.3.3. Expressão do gene *CcGoIS1*

O gene *CcGoIS1* está relacionado à síntese de oligossacarídeos derivados da rafinose, como galactinol, sendo que seus níveis de expressão tendem a aumentar em resposta à seca devido à adoção de mecanismos osmorreguladores (DOS SANTOS et al., 2015).

A análise da expressão do gene *CcGoIS1* apresentou diferenças significativas na comparação entre os genótipos estudados nos níveis de estresse severo e na recuperação. Na condição de déficit severo o genótipo P50 (6,50) apresentou a maior média, seguido pelo genótipo P59 (3,80). Todos os demais genótipos testados não apresentaram diferenças significativas entre si. (Tabela 3).

Tabela 3. Média da expressão relativa do gene *CcGo/S1* em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.

Tratamentos	Genótipos													
	120	109	3T	P6	7T	P2	4S	P10	1T	6T	P50	P40	44S	P59
Déficit Moderado	0.94A	0.25A	0.49A	0.53A	0.47A	1.07A	1.03A	0.55A	0.71A	0.45A	1.10A	0.50A	0.09A	1.01A
Déficit Severo	0.47C	0.16C	1.15C	5.21A	1.4C	1.59C	1.56C	0.55C	0.54C	1.07C	6.50A	0.88C	0.09C	3.80B
Recuperação	0.32C	0.46BC	1.29ABC	2.28A	1.62ABC	0.36C	1.19ABC	0.8ABC	1.9ABC	1.0ABC	2.17AB	1.2ABC	0.40C	1.9ABC
Controle Irrigado	0.42	0.46	0.46	0.79	0.16	0.16	0.21	0.92	0.20	0.15	0.60	0.12	0.33	0.12

Médias seguidas pela mesma letra na linha correspondente não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Galactinol sintase pertence a uma família de glicosiltransferases envolvida na primeira etapa da biossíntese de oligossacarídeos da família da rafinose (RFO), catalisando a transferência de UDP-D-galactose para mioinositol, sendo considerada a principal reguladora desta via biossintética (SCHNEIDER; KELLER, 2009). RFOs podem atuar em situações de estresse como solutos compatíveis que garantem proteção para a planta e também parecem ter um papel importante como antioxidante contra os danos induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS) sob condições de estresse (ELSAYED et al., 2014).

O gene *Go/S* foi sistematicamente identificado e caracterizado em diferentes espécies de plantas (DOS SANTOS et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2020; SALVI et al., 2020), apresentando potencial para programas de melhoramento e / ou engenharia molecular, sendo regulado positivamente em condições de estresse abiótico (TAJI et al., 2002; WANG et al., 2012; LIU et al., 2021; MA et al., 2021).

Estudos têm mostrado que o aumento da expressão de *Go/S1* em plantas de café está associado a um aumento na concentração de galactinol e rafinose nas células (DOS SANTOS et al., 2011). Esses açúcares solúveis atuam como osmólitos compatíveis, ajudando a manter o equilíbrio osmótico das células sob condições de seca e reduzindo o potencial de desidratação celular (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2021). Além disso, o galactinol e a rafinose também têm um papel na proteção das células contra danos oxidativos, agindo como antioxidantes e reduzindo a formação

de radicais livres, o que pode melhorar a tolerância da planta a condições de estresse (DOS SANTOS et al., 2015).

A ativação do gene *Go/S1* também tem sido associada a uma maior expressão de outros genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico em plantas, como genes que codificam enzimas antioxidantes e proteínas de choque térmico (SALVI et al., 2020). Isso sugere que *Go/S1* pode desencadear uma cascata de respostas celulares que ajudaria as plantas de café a lidarem com o estresse hídrico (DOS SANTOS et al., 2020).

A análise da expressão do gene *CcGo/S1* mostrou aumento significativo apenas nos genótipos P50 (6,50), P6 (5,21) e P59 (3,80) na condição de déficit severo. Estes genótipos mostraram grande elevação da expressão na condição de déficit severo, permanecendo com níveis mais altos na condição de recuperação (Figura 7).

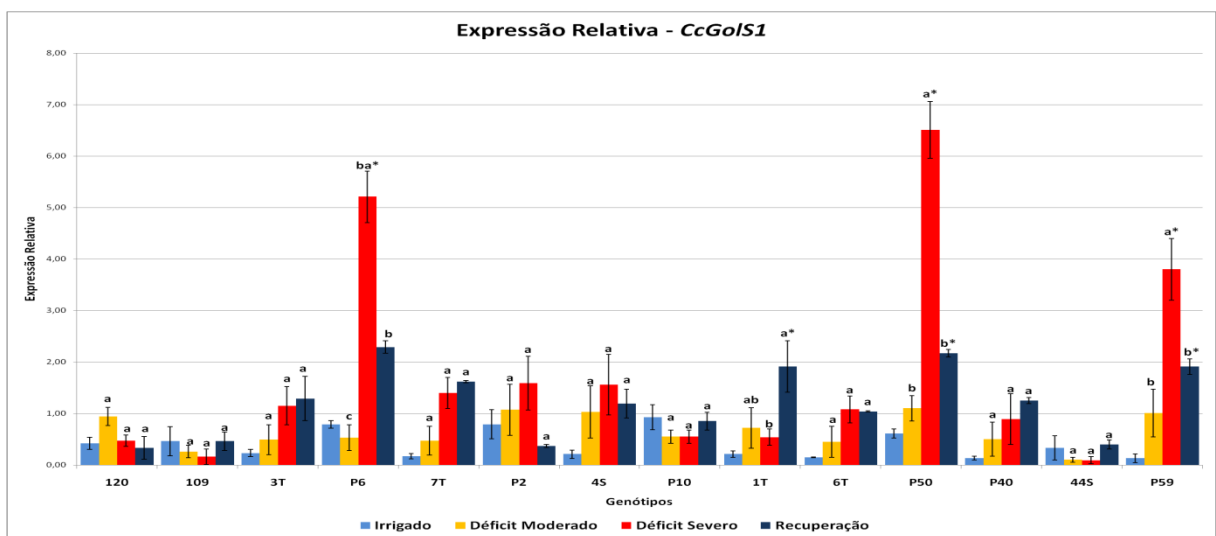


Figura 7. Expressão relativa do gene *CcGo/S1* normalizada pelo gene *CcUBQ10* utilizado como gene endógeno em diferentes estágios de déficit hídrico. Genótipos com a mesma letra em relação às diferentes condições de déficit não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre níveis de estresse (moderado, severo e recuperação) em relação ao Controle Irrigado pelo Teste de Dunnet a 5% de probabilidade. Valores são a média de 3 repetições, barras representam o erro padrão da média.

A comparação dos níveis de expressão de *Go/S1* nas diferentes condições experimentais demonstra que para a maioria dos genótipos estudados não ocorreu variações significativas nas condições irrigadas e em déficit. Destoam deste perfil os genótipos P59, P6 e P50.

Dos Santos et al. (2015) relatam a expressão diferencial de *CcGoIS1* em genótipos de *C. canephora* com perfis de tolerância à seca contrastantes, havendo maior expressão nos genótipos tolerantes, o que poderia ser sugerido pelo comportamento dos genótipos P59, P6 e P50 nas condições de seca. No genótipo 120, caracterizado como tolerante, o nível de expressão não sofreu muitas variações, sugerindo que outras isoformas de *GoIS* poderiam ter relação com a resposta à seca, conforme abordado por De Oliveira Santos et al. (2021) ou que nas condições experimentais utilizadas, os mecanismos de acumulação de rafinose e outros açúcares não seriam prioritários no processo de aclimação das plantas. Como a síntese de galactinol consiste numa etapa importante na biossíntese de oligossacarídeos derivados da rafinose, a dosagem futura destes oligossacarídeos nos genótipos estudados consistiria em relevante fonte de dados para caracterização dos mesmos com relação à resposta à seca.

Outra possível explicação possível é que o genótipo 120 já possua altos níveis de expressão basal deste gene em condições normais. Isso pode ser resultado de adaptações evolutivas ou de seleção artificial em programas de melhoramento genético que buscaram aumentar a tolerância ao estresse hídrico nesse genótipo específico. Dessa forma, como o genótipo 120 já possui altos níveis de expressão do gene *CcGoIS1* em condições normais, pode ser que o aumento da expressão desse gene em resposta ao estresse hídrico não seja tão necessário quanto em outros genótipos. Assim, a planta pode manter os níveis de expressão desse gene estáveis durante períodos de estresse hídrico moderado, sem sofrer muitas variações.

Em relações aos genótipos suscetíveis a planta não foi capaz de ativar os mecanismos necessários para aumentar a expressão desse gene. Isso pode ser resultado de variações na regulação gênica, em que outros genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico não estão sendo ativados corretamente, ou de outras limitações fisiológicas da planta

Dada a complexidade dos processos fisiológicos envolvidos nos mecanismos de tolerância à seca, é evidente que vários mecanismos moleculares, fisiológicos e bioquímicos são necessários para a sobrevivência e aclimação do café em condições adversas de estresse.

5.4. CONCLUSÕES

De acordo com as análises de expressão gênica realizadas é possível observar que os genes *CcMPR1*, *RBCS1* e *CcGoIS1* apresentaram expressão diferencial nas distintas condições de déficit a que os genótipos foram submetidos, mostrando também que a maior parte dos genótipos conseguiu se recuperar após reidratação.

CcMPR1 apresentou potencial uso como marcador de estresse, além de indicar a adoção de estratégias de defesa em café por meio de mecanismos osmorreguladores sendo que os clones 120, 6T, 1T, P50, P40, 7T, P2 e 4S foram os mais promissores. Com relação à expressão *RBCS1* os genótipos 3T, P6 e 1T se destacaram ao apresentarem perfis de recuperação semelhantes ao observado no genótipo tolerante.

A expressão de *CcGoIS1* nas diferentes condições experimentais demonstrou que na maior parte dos genótipos estudados não ocorreram variações significativas nas condições irrigadas e em déficit, entretanto os clones P59, P6 e P50 apresentaram perfis distintos aos demais, com aumento da expressão gênica e melhores potenciais de recuperação pós estresse.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, T.; GUENZI, A.C.; MARTIN, B.; CUSHMAN, J.C. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. **Plant Physiology**. v. 131, p. 1748–1755, 2003.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. **Nat Methods**. v. 10, n. p. 1063–1067, 2013.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**. v. 55, p. 611–622, 2009.

CHUNG, P.J.; JUNG, H.; JEONG, D.H. Transcriptome profiling of drought responsive noncoding RNAs and their target genes in rice. **BMC Genomics**. v. 17, p. 563, 2016.

DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; PINHEIRO, H. A.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**. v.164, p.111–117, 2003.

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

DE CARVALHO, K.; PETKOWICZ, C.L.O.; NAGASHIMA, G.T. Homeologous genes involved in mannitol synthesis reveal unequal contributions in response to abiotic stress in *Coffea arabica*. **Molecular and Genetic Genomics**. v. 289, p. 951–963, 2014.

DE OLIVEIRA SANTOS, M.; COELHO, L. S.; CARVALHO, G. R. et al. Photochemical efficiency correlated with candidate gene expression promote coffee drought tolerance. **Scientific Reports**, v. 11, p. 7436, 2021.

DOS SANTOS, T.B.; BUDZINSKI, I.G.F.; MARUR, C.J.; PETKOWICZ, C.L.O.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 49, p. 441–448, 2011.

DOS SANTOS, T.B.; DE LIMA, R.B.; NAGASHIMA, G.T.; PETKOWICZ, C.L.; CARPENTIERI-PIPOLO, V.; PEREIRA, L.F.; DOMINGUES, D.S.; VIEIRA, L.G. Galactinol synthase transcriptional profile in two genotypes of *Coffea canephora* with contrasting tolerance to drought. **Genetics and Molecular Biology**. v. 38, n. 2, p. 182–90, 2015.

DOS SANTOS, T.B.; VIEIRA, L.G.E. Involvement of the galactinol synthase gene in abiotic and biotic stress responses: A review on current knowledge. **Plant Gene**, v.24, 100258, 2020.

ELSAYED, A.I.; RAFUDEEN, M.S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. **Plant Biology**. v. 16, p. 1-8, 2014.

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S.; DE MUNER, L. H.; LANI, J. A.; PREZOTTI, L. C.; VENTURA, J. A.; MARTINS, D. S.; MAURI, A. L.; MARQUES, E. M. G.; ZUCATELLI, F. Café Conilon: técnicas de produção com variedades melhoradas. 4. ed. revisada e ampliada. Vitória, ES: **Incaper**: Circular Técnica, p. 74, 2012.

FREIRE, L.P.; MARRACCINI, P.; RODRIGUES, G.C.; ANDRADE, A.C. Analysis of the mannose 6 phosphate reductase gene expression in Coffee trees submitted to water deficit **Coffee Science**. v. 8, n. 1, p. 17-23, 2013.

GILL, S.S.; ANCA MACOVEI, A.; JIMENEZ-BREMONT, J.F.; KHAN, N.A.; TUTEJA, N. Biotechnology and crop improvement under changing environment: Current interventions. **Plant Gene**. v. 32, n. 100376, 2022.

LIMA, A.L.S.; DAMATTA, F.M.; PINHEIRO, H.A.; TOTOLA, M.R.; LOUREIRO, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental Experimental Botany**. v. 47, n. 3, p. 239-247, 2002.

LIU, L.; WU, X.; SUN, W.; YU, X.; DEMURA, T.; LI, D.; ZHUGE, Q. Galactinol synthase confers salt-stress tolerance by regulating the synthesis of galactinol and

raffinose family oligosaccharides in poplar. **Industrial Crops and Products**, v. 165, p. 113432, 2021.

MA, S.; LV, J.; LI, X.; JI, T.; ZHANG, Z.; GAO, L. Galactinol synthase gene 4 (CsGolS4) increases cold and drought tolerance in *Cucumis sativus* L. by inducing RFO accumulation and ROS scavenging. **Environmental and Experimental Botany**, v. 185, p. 104406, 2021.

MARRACCINI, P.; FREIRE, L.P.; ALVES, G.S.; VIEIRA, N.G.; VINECKY, F.; ELBELT, S.; RAMOS, H.J.O.; MONTAGNON, C.; VIEIRA, L.G.E.; LEROY, T.; POT, D.; SILVA, V.A.; RODRIGUES, G.C.; ANDRADE, A.C.P. RBCS1 expression in coffee: *Coffea orthologs*, *Coffea arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 85, p. 1-23, 2011.

MARRACCINI, P.; VINECKY, F.; ALVES G.S.C.; RAMOS, H.J.O.; ELBELT, S.; VIEIRA, N.G.; CARNEIRO, F.A.; SUJII, P.S.; ALEKCEVETCH, J.C.; SILVA, V.A.; DAMATTA, F.M.; FERRAÃO, M.A.G.; LEROY, T.; POT, D.; VIEIRA, L.G.E.; SILVA, F.R.; ANDRADE, A.C. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**. v. 63, p. 4191–212, 2012.

OLIVEIRA, L.N.L.; ROCHA, R.B.; FERREIRA, F.M.; VICTOR MOUZINHO SPINELLI, V.M.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L. Selection of *Coffea canephora* parents from the botanical varieties Conilon and Robusta for the production of intervarietal hybrids. **Ciência Rural**, v. 48, p.1–7, 2018.

PARK, S.H.; JEONG, J.S.; REDILLAS, M.C.F.R. Transgenic overexpression of UIP1, an interactor of the 30 untranslated region of the Rubisco small subunit mRNA, increases rice tolerance to drought. **Plant Biotechnology Reports**. v. 7, p. 83–90, 2013.

PATONNIER, M.P.; PELTIER, J.P.; MARIGO, G. Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. **Journal of Experimental Botany**. v. 50, p. 1223–1229, 1999.

PINHEIRO, H.A.; DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; FONTES, E.P.B.; LOUREIRO, M.E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**. v. 167, n. 6, p. 1307-1314, 2004.

RAMALHO, J.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; GUERRA, M.; REBOREDO, F.H.; MÁGUAS, C.M. Can elevated air [CO₂] conditions mitigate the predicted warming impact on the quality of coffee bean? **Frontiers in Plant Science**. v. 9, p. 1–14, 2018a.

RONCHI, C. P.; DAMATTA, F. M. Aspectos fisiológicos do café conilon. In: FERRAÃO, G. F. et al. (Orgs.). *Café Conilon*. Vitória: Incaper, p. 94-119, 2007.

SALVI, P.; KAMBLE, N.U.; MAJEE, M. Ectopic over-expression of ABA-responsive Chickpea galactinol synthase (CaGolS) gene results in improved tolerance to

dehydration stress by modulating ROS scavenging. **Environmental and Experimental Botany**. v. 171, p. 103957, 2020.

SCHNEIDER, T.; KELLER, F. Raffinose in chloroplasts is synthesized in the cytosol and transported across the chloroplast envelope. **Plant Cell Physiology**. v. 50, p. 2174-2182, 2009.

SICHER, R.C.; BARNABY, J.Y. Impact of carbon dioxide enrichment on the responses of maize leaf transcripts and metabolites to water stress. **Physiologia Plantarum**, v. 144, n. 3, p. 238–253, 2012.

SICKLER, C.M.; EDWARDS, G.E.; KIIRATS, O.; GAO, Z.; LOESCHER, W. Response of mannitol producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. **Functional Plant Biology**. v. 34, p. 382-391, 2007.

SILVA, P.C.D.; JUNIOR, W.Q.R.; RAMOS, M.L.G.; ROCHA, O.C.; VEIGA, A.D.; SILVA, N.H.; BRASILEIRO, L.D.O.; SANTANA, C.C.; SOARES, G.F.; MALAQUIAS, J.V.; VINSON, C.C. Physiological Changes of Arabica Coffee under Different Intensities and Durations of Water Stress in the Brazilian Cerrado. **Plants**. v. 11, n. 2198, 2022.

SOUZA-SOBREIRA, F. B. Respostas morfofisiológicas e herança materna para tolerância à seca em progênies de café conilon. 96 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre. 2017.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**. v. 29, p. 417–426, 2002.

VIEIRA, N.G.; CARNEIRO, F.A.; SUJII, P.S.; ALEKCEVETCH, J.C.; FREIRE, L.P.; VINECKY F. Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. **Tropical Plant Biology**. v. 6, p. 181–90, 2013.

VINECKY, F. Identificação e caracterização de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro. (2009). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 115p.

WANG, D.; YAO, W.; SONG, Y.; LIU, W.; WANG, Z. Molecular characterization and expression of three galactinol synthase genes that confer stress tolerance in *Salvia miltiorrhiza*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1838–1848, 2012.

ZHUANG, K.; WANG, J.; JIAO, B.; CHEN, C.; ZHANG, J.; MA, N.; MENG, Q. SIWHIRLY1 maintains leaf photosynthetic capacity in tomato by regulating the expression of SIRbcS1 under chilling stress. **Journal of Experimental Botany**, v.71, 12, p. 3653-3663, 2020.

6. CAPÍTULO 2: Características Bioquímicas Associadas à Tolerância à Seca em Genótipos de *Coffea canephora*.

RESUMO

O Estado do Espírito Santo é o maior produtor de café conilon do Brasil, sendo responsável por aproximadamente 70% da produção nacional. Avaliações fisiológicas, bioquímicas e moleculares de diferentes cultivares sob estresse hídrico são de extrema importância para entendimento de como as plantas respondem à falta de água, auxiliando no desenvolvimento de estratégias eficazes visando o aumento da produtividade agrícola, com o desenvolvimento de variedades de plantas mais resistente a déficits. Neste sentido, objetivou-se com este estudo avaliar as respostas bioquímicas em genótipos de *Coffea canephora* submetidos a déficit hídrico em diferentes períodos, com progressão do estresse e na fase recuperação, para entender melhor o mecanismo de tolerância à seca. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação no delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, 14 tratamentos (genótipos) e 2 fatoriais (irrigado e déficit), divididos em 4 blocos, totalizando 112 plantas experimentais. O comportamento dos genótipos foi avaliado com base nas características bioquímicas de composição de nitrato, nitrogênio orgânico, prolina e compostos fenólicos foliares nas condições experimentais. Diferentes genótipos apresentaram respostas fisiológicas para tolerância ao estresse hídrico, com destaque para alguns que mostraram características de tolerância à seca associadas a parâmetros específicos. Os teores de nitrogênio orgânico e prolina foram os parâmetros bioquímicos que apresentaram as maiores diferenças entre os genótipos, podendo ser utilizados como marcadores de estresse hídrico. O genótipo 120 apresentou resultados promissores em todos os parâmetros testados, evidenciando sua classificação como tolerante à seca. As análises bioquímicas sugerem a adoção de mecanismos osmoregulatórios em diversos genótipos testados em resposta à seca, sendo importante a realização de novos estudos no sentido de se entender o funcionamento das distintas vias metabólicas acionadas.

Palavras-chave: nitrato; nitrogênio orgânico; prolina; compostos fenólicos

6.1. Introdução

O café é uma cultura de grande importância global, sendo responsável por uma indústria que movimenta bilhões de dólares e que desenvolve a economia de muitos países, especialmente aqueles em desenvolvimento, como o Brasil, que se destaca como o maior produtor e exportador mundial, além de possuir o segundo maior mercado consumidor (DAVIS et al., 2020). Em 2022 as exportações mundiais atingiram recorde histórico de cerca de US\$ 9,2 bilhões, representando um aumento de 45% em relação à safra de 2021, evidenciando a importância econômica do mesmo no comércio internacional (CONAB, 2023).

O Estado do Espírito Santo se destaca como o maior produtor de café conilon do Brasil, representando cerca de 70% da produção nacional e até 20% da produção mundial de café robusta. Além disso, o conilon é a principal fonte de renda em 80% das propriedades rurais localizadas em regiões quentes do estado, respondendo por 37% do PIB Agrícola gerando aproximadamente 250 mil empregos diretos e indiretos (CONAB, 2023).

Fatores abióticos como temperatura desfavorável, seca, inundação, salinidade e estresse por metais pesados têm um grande impacto no crescimento e na produtividade das culturas vegetais (NAKASHIMA et al., 2014, AL-SAMMARRAIE et al., 2020; BILEN et al., 2023). Estes estresses podem reduzir em até 50% os benefícios para algumas culturas importantes no mundo, afetando os processos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares das plantas, obrigando as mesmas a desenvolverem mecanismos de fuga, aclimatação e tolerância para sobreviverem a tais condições estressantes (HOSSAIN et al., 2022).

As flutuações climáticas representam uma grande ameaça para a cultura do cafeeiro, cuja fragilidade diante das oscilações de temperatura e disponibilidade de água é amplamente conhecida (BILEN et al., 2023). A produção anual de café é fortemente influenciada pelas variáveis ambientais limitantes, como temperatura e disponibilidade de água (DAMATTA; RAMALHO, 2006; RAMALHO et al., 2018), o que aumenta a preocupação com as previsões de aumento das temperaturas médias globais feitas pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) (IPCC, 2016; DAMATTA et al., 2018).

Avaliações fisiológicas, bioquímicas e moleculares relacionadas às respostas de plantas submetidas a déficit hídrico são de extrema importância para

entendimento das vias metabólicas associadas a estas respostas. Além disso, auxiliam no desenvolvimento de estratégias eficazes visando o aumento da produtividade agrícola, como o desenvolvimento de variedades de plantas mais resistentes e adoção de práticas de manejo adequadas em regiões afetadas pelo déficit hídrico. Neste sentido, objetivou-se com este estudo avaliar as respostas bioquímicas em genótipos de *Coffea canephora* submetidos a déficit hídrico em diferentes períodos, com progressão do estresse e na fase recuperação, para entender melhor os mecanismos de tolerância à seca.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. Material genético

Os materiais genéticos utilizados neste trabalho foram obtidos e cedidos pelo programa de Melhoramento de Café do Incaper, cultivados na Fazenda Experimental de Marilândia (FEM), localizada no município de Marilândia, região Noroeste do Estado do Espírito Santo.

Foram avaliados 14 genótipos de café conilon, 3 pré-selecionados como tolerantes (3T, P6 e 7T) e 3 como suscetíveis (P2, P4 e P10) da população 120x109, 3 pré-selecionados como tolerantes (1T, 6T e P50) e 3 como suscetíveis (P40, P44, e P59) da população 109x120 e os genótipos parentais 120 e 109. O genótipo 120 é caracterizado como de porte médio, maturação média, suscetível à ferrugem, vigoroso e tolerante à seca; e o clone 109, como genótipo de de porte médio, maturação média, suscetível à ferrugem e à seca.

Do estudo realizado por Souza-Sobreira, (2017) foram selecionados os genótipos descritos acima. As plantas foram preparadas no campo (FEM) para produção brotações e ramos para serem utilizadas na produção de mudas clonais por estaquia.

6.2.2. Experimento de Avaliação de progênes em condições de estresse hídrico

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal do Espírito Santo no delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, 14 tratamentos (6 progênes do cruzamento 120 x 109, 06 progênes do cruzamento

109 x 120 e os dois genitores) e 2 fatoriais (irrigado e não irrigado), divididos e 4 blocos, totalizando 112 plantas experimentais.

6.2.3. Condições experimentais e avaliação da quantidade de água no experimento

As plantas foram cultivadas em vasos de 18 litros para os ensaios em casa de vegetação. Inicialmente todas as plantas foram irrigadas diariamente e fertilizadas semanalmente com solução de nutrientes de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950). Ao atingirem cerca de 10 meses de idade, as plantas foram submetidas ao estresse hídrico no experimento sem irrigação, sendo que o experimento com irrigação continuou sendo hidratado diariamente. O solo foi mantido na capacidade de campo antes de se instalar o experimento para todas as 112 plantas e o tratamento controle irrigado foi mantido na capacidade de campo em todo decorrer do experimento. Para os demais vasos foram submetidos ao estresse hídrico por meio da limitação da irrigação, que se iniciou no dia 05 de abril 2019 (dia 0) aplicando-se 75 % de água no tratamento com déficit hídrico em relação ao tratamento controle irrigado. De 14 em 14 dias a irrigação do tratamento com déficit hídrico foi limitada respectivamente em 60 %, 45 % e 30 % com relação ao tratamento controle irrigado. A partir do momento em que as plantas atingiram o potencial hídrico de característico de déficit hídrico severo, estas voltaram a receber a irrigação de capacidade de campo do solo (Recuperação pós-estresse). O estado da água nas folhas foi avaliado por meio da determinação do potencial de pressão (ψ_t) utilizando-se uma Câmara de Scholander em todas as campanhas realizadas. Para realização das análises bioquímicas foram coletadas quatro folhas do terceiro ou quarto par do ramo plagiotrópico, nos controles irrigados, quando as plantas atingiram o estágio de déficit hídrico moderado (ψ_t -1,5 MPA), déficit hídrico severo (ψ_t -3,00 MPA) e na fase de recuperação. As amostras foliares coletadas foram acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

6.2.4. Análises Bioquímicas dos tecidos foliares

6.2.4.1. Quantificação de nitrato

A quantificação de NO_3 foi realizada conforme Cataldo et al. (1975), com algumas modificações. Para o preparo do extrato bruto, foram pesadas 0,1 g de folhas liofilizadas/ trituradas em tubos de ensaio e adicionados 1 mL de etanol absoluto e 10 mL de água destilada, levou-se ao banho-maria a temperatura de 45°C por 60 minutos. Ao esfriarem os tubos, foi adicionado aproximadamente 250 mg de carvão ativo, agitado e filtrado em papel de filtro lento (esta etapa foi repetida até obter um filtrado cristalino).

As concentrações da curva padrão foram de 0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm e 100 ppm, utilizando-se como solução estoque de referência o nitrato de potássio na concentração de 0,1628%. No preparo da amostra para leitura no espectrofotômetro, foram utilizados 20 μL do extrato bruto, 80 μL de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico absoluto e 1900 μL de hidróxido de sódio 2N em tubos de 2 mL. Após 30 minutos de repouso, foi feita leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro a 410 nm.

Para determinação exata de NO_3 na amostra, levou-se em consideração a equação da curva padrão, a quantidade de amostra pesada inicialmente, as diluições e a quantidade do extrato utilizado para fazer a leitura no espectrofotômetro.

6.2.4.2. Quantificação de nitrogênio orgânico

Para preparar o extrato bruto, as folhas liofilizadas/trituradas foram pesadas em tubos digestores e pré-digeridas com 1 mL de ácido sulfúrico P.A. por aproximadamente 12 horas. Em seguida, 1 mL de peróxido de hidrogênio 35% foi adicionado e as amostras foram submetidas a um bloco digestor, aquecendo gradualmente até atingir 300°C e mantendo essa temperatura por 30 minutos. Após resfriamento para 150°C, amostras com extrato amarelo ou preto foram submetidas a nova digestão com adição de 1 mL de peróxido de hidrogênio e aquecimento até 200°C por 15 minutos para completar a clarificação. Após resfriamento, adicionou-se 24 mL de água destilada a cada tubo e as amostras foram homogeneizadas em vórtex.

As concentrações da curva padrão utilizadas foram de 0 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm e 8 ppm, utilizando-se como solução estoque de referência o sulfato de amônio na concentração de 0,025%. Para o preparo das amostras foram utilizados 100 µL do extrato, 3,9 mL de água destilada, 500 µL de tartarato de sódio 10% e 500 µL de reagente de Nessler, em tubos de ensaio de 5 mL. Após 20 minutos de repouso, foi feita leitura da absorbância da amostra no espectrofotômetro a 480 nm.

Para determinação de NH_4 na amostra, levou-se em consideração a equação da curva padrão, a quantidade de amostra pesada inicialmente, as diluições e a quantidade do extrato utilizado para fazer a leitura no espectrofotômetro.

6.2.4.3. Extrato etanólico para determinação de compostos fenólicos e aminoácido prolina

Foram pesados 50 mg de folhas liofilizadas/ maceradas em tubos de 2 mL e adicionados 500 µL de etanol 98% com posterior agitação em vórtex. Em seguida os tubos foram levados ao banho maria à 80°C por 20 minutos, centrifugados a 14000 rpm (Thermo Scientific - Heraeus Pico e Fresco) por 5 minutos e coletado o sobrenadante, adicionando em um novo tubo de 2 mL. Adicionou-se 500 µL de etanol 80% ao pellet, novamente agitou-se no vórtex, levou-se ao banho maria a 80°C por 20 minutos, centrifugou-se a 14000 rpm (Thermo Scientific - Heraeus Pico e Fresco) por 5 minutos e coletou-se o sobrenadante, misturando-se ao sobrenadante anterior. O procedimento foi repetido, acrescentando 500 µL de etanol 50% e misturando o novo sobrenadante aos anteriores.

6.2.4.3.1. Quantificação de compostos fenólicos solúveis totais

Para preparar a amostra, o extrato etanólico foi diluído adicionando 50 µL do extrato em um tubo e completando o volume para 2 mL com etanol 80%. Em seguida, 30 µL dessa solução foram combinados com 470 µL de água destilada, 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (previamente diluído adicionando 50 mL em 450 mL de água destilada) e 1250 µL de carbonato de sódio a 10%. Após homogeneização, a absorbância da solução foi medida em um espectrofotômetro a 725 nm.

Para determinação de fenol, levou-se em consideração a equação da curva padrão, a quantidade de amostra pesada inicialmente, a diluição do extrato etanólico e a quantidade do extrato utilizado para fazer a leitura no espectrofotômetro.

Para a quantificação de fenol total, utilizou-se como padrão o ácido tânico. Para isso, 500 mg de ácido tânico foram diluídos em 100 mL de etanol 80%. Em seguida, 1 mL da solução foi diluído em 100 mL de etanol 80%. Para o preparo da curva padrão foi utilizado a solução de ácido tânico rediluída, na concentração de 0 µg, 1,25 µg, 2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg e 10 µg.

6.2.4.3.2. Quantificação do aminoácido prolina

Para o preparo da curva padrão foi utilizado uma solução de prolina a 50 µM, nas concentrações de 0 µmol, 0,020 µmol, 0,050 µmol, 0,086, 0,160 µmol, 0,188 µmol, 0,26 µmol e 0,29 µmol. Para o preparo da amostra foram utilizados 150 µL do extrato etanólico bruto, 2,75 mL de água destilada, 100 µL de glicina 126 mM, 2 mL de ácido acético glacial, 2 mL de reagente de ninhidrina. Os tubos foram levados ao banho maria à 95°C por 35 minutos, em seguida a reação foi interrompida depositando-se os tubos em banho de gelo, posteriormente, acrescentou-se 4 mL de tolueno, seguindo-se à agitação dos tubos e foram agitados vigorosamente no vórtex por 10 segundos. O cromóforo contendo tolueno (fase rósea superior) foi aspirado com uma pipeta descartável e colocado em outro tubo de vidro. Em seguida foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 515 nm. Para determinação exata de prolina nas amostras, levou-se em consideração a equação da curva padrão, a quantidade do extrato etanólico total produzido e a quantidade de amostra pesada inicialmente (BATES et al., 1973).

6.2.5. Análises Estatísticas

Os dados das análises bioquímicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando um fatorial duplo (14 genótipos x 3 condições de estresse hídrico) com as médias sendo comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas através dos pacotes ExpDes.pt e Tratamento.addo software R Studio versão 4.1.0 (R CORE TEAM, 2021). Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% de probabilidade.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Análise de nitrato e nitrogênio orgânico

A análise de nitrato não mostrou diferenças significativas nas comparações entre os genótipos nas condições de déficit moderado e severo. Na condição experimental de recuperação, os genótipos 120 (0,96) e 4S (0,95) apresentaram maiores médias (Tabela 1). Considerando que os genótipos 120 e 109 apresentam características contrastantes com relação à resposta à seca, esperavam-se diferenças entre os mesmos na condição de déficit hídrico.

Tabela 1. Média do teor de nitrato (%) em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.

	Tratamentos	Genótipos													
		120	109	3T	P6	7T	P2	4S	P10	1T	6T	P50	P40	44S	P59
Moderado	Irrigado	0,82 a	0,83 a	0,77 a	0,86 a	0,82 a	0,87 a	0,82 a	0,88 a	0,84 a	0,84 a	0,86 a	0,82 a	0,81 a	0,84 a
	Déficit	0,82 a	0,85 a	0,81 a	0,79 a*	0,81 a	0,79 a*	0,83 a	0,79 a*	0,84 a	0,84 a	0,79 a*	0,79 a	0,83 a	0,82 a
Severo	Irrigado	0,98 a	0,82 b	0,83 b	0,87 b	0,83 b	0,86 b	0,88 b	0,80 b	0,87 b	0,86 b	0,84 b	0,86 b	0,84 b	0,84 b
	Déficit	0,84 a*	0,80 a	0,86 a	0,82 a	0,86 a	0,81 a	0,83 a	0,85 a	0,83 a	0,85 a	0,88 a	0,82 a	0,82 a	0,86 a
Recuperação	Irrigado	0,84 b	0,84 b	0,85 b	0,89 a	0,88 a	0,84 b	0,91 a	0,91 a	0,79 b	0,80 b	0,89 a	0,80 b	0,86 b	0,84 b
	Déficit	0,96 a*	0,84 b	0,81 b	0,82 b	0,89 b	0,84 b	0,95 a	0,83 b	0,83 b	0,80 b	0,86 b	0,87 b*	0,86 b	0,85 b

Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições. Os valores correspondem ao teor de nitrato (%) na folha.

Na condição de déficit moderado houve diferenças significativas nos genótipos P6 (0,79), P2 (0,79), P10 (0,79) e P50 (0,79) com redução nos teores de nitrato quando comparados aos respectivos controles irrigados (Figura 1). Segundo Gloser et al., (2020) o conteúdo de nitrato de plantas submetidas a condições de déficit hídrico pode sofrer variações de acordo com a espécie envolvida. Em *V. faba*, *N. tabacum* and *P. sativum*, o conteúdo de NO_3 foi reduzido tanto nas folhas como na raiz durante a seca. Em milho, o teor de NO_3 nas folhas diminuiu significativamente sob estresse hídrico, reduzindo também a atividade da enzima nitrato redutase envolvida em seu metabolismo (SONG, 2019). Resposta semelhante foi observada em estudo com batata doce (XIA et al., 2020).

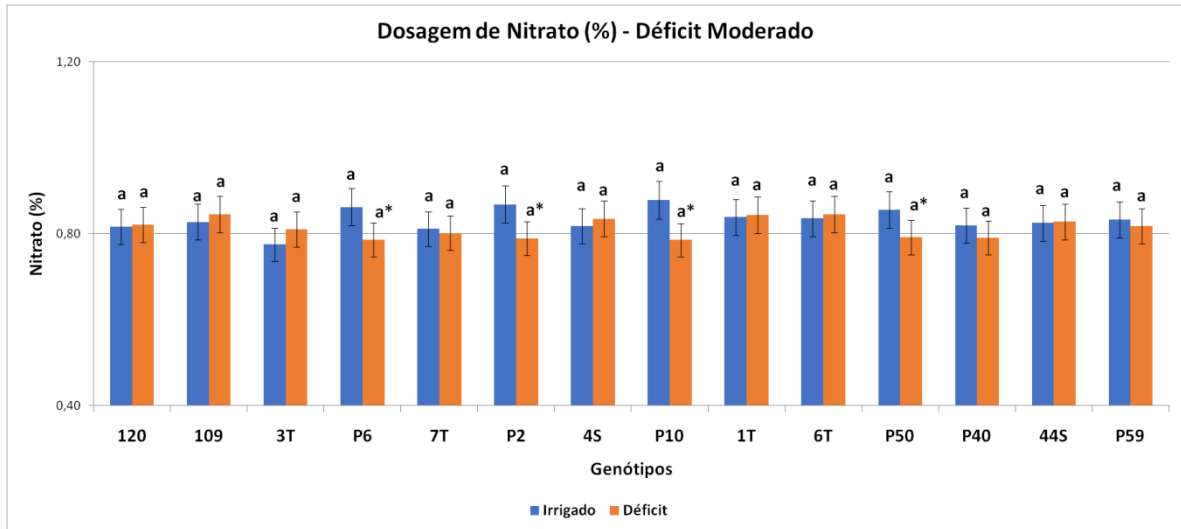


Figura 1: Dosagem de nitrato em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico moderado. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

No déficit severo, somente o genótipo 120 (0,84) apresentou diferença significativa com redução no teor de nitrato quando comparado ao controle irrigado (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados por MELO (2008) ao trabalharem com café sob deficiência hídrica, verificando uma diminuição do fluxo de nitrato em decorrência da falta de umidade no solo. Importante destacar que DaMatta et al. (2002), sugerem que *C. canephora* cultivado sob alto teor de nitrogênio apresenta maior capacidade de lidar com a seca, potencialmente aumentando a capacidade de absorção de água em vez de minimizar a perda de água através do controle estomático.

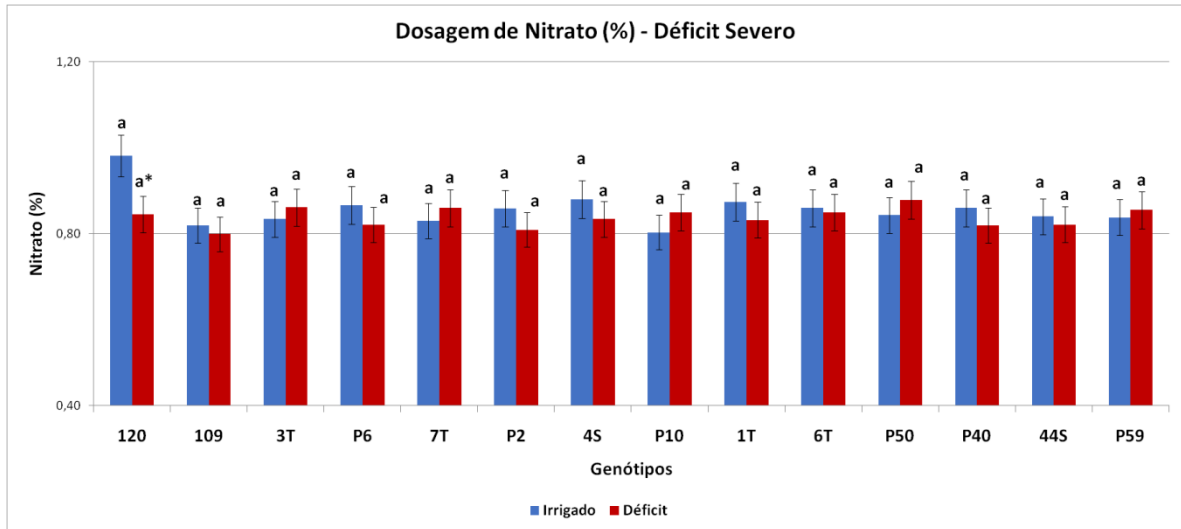


Figura 2: Dosagem de nitrato em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico severo. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

Na fase de recuperação ocorreu aumento significativo de nitrato nos genótipos 120 (0,96) e P40 (0,87) atingindo quantitativos superiores aos observados em seus respectivos controles irrigados (Figura 3).

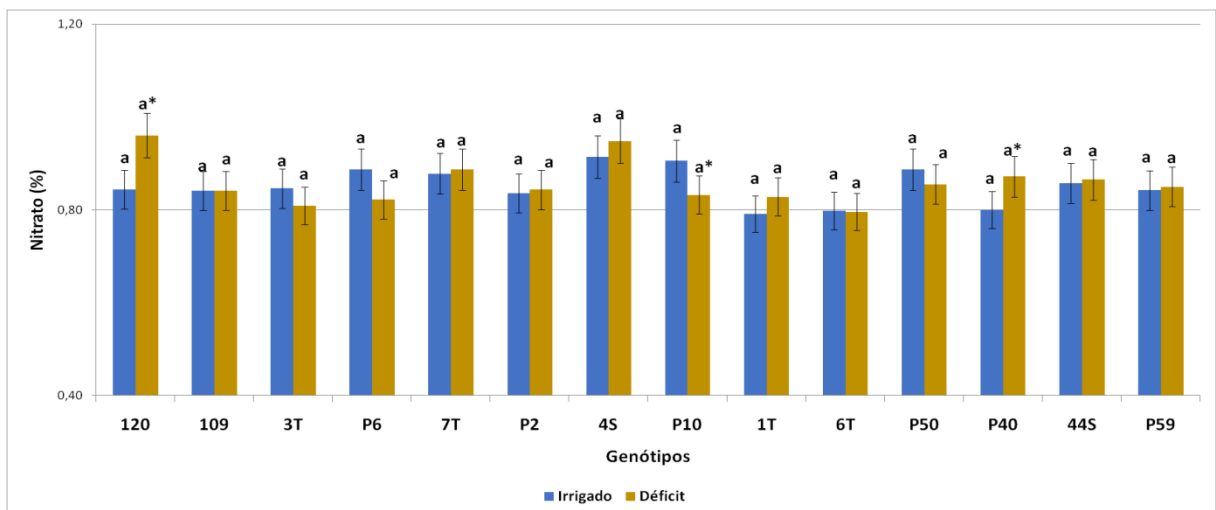


Figura 3: Dosagem de nitrato em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e recuperação. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

Gonzalez-Dugo et al. (2012) observaram que o aumento da tensão hídrica no solo devido ao déficit leva ao acúmulo significativo de nitrogênio nas raízes, o que

pode limitar sua alocação nas folhas. Tal fato poderia explicar que nenhum dos genótipos apresentou aumento significativo nos teores de nitrato nas condições de déficit moderado e severo, sendo que os genótipos P2, P10, P50, P6 e 120 tiveram redução no teor de nitrato em algumas destas fases. Na recuperação a maioria destes apresentou teores semelhantes aos controles irrigados, destacando o genótipo 120 com aumento significativo nesta fase e o genótipo P2 que em contrapartida teve redução no teor de nitrato quando comparado ao irrigado. (Figura 4).

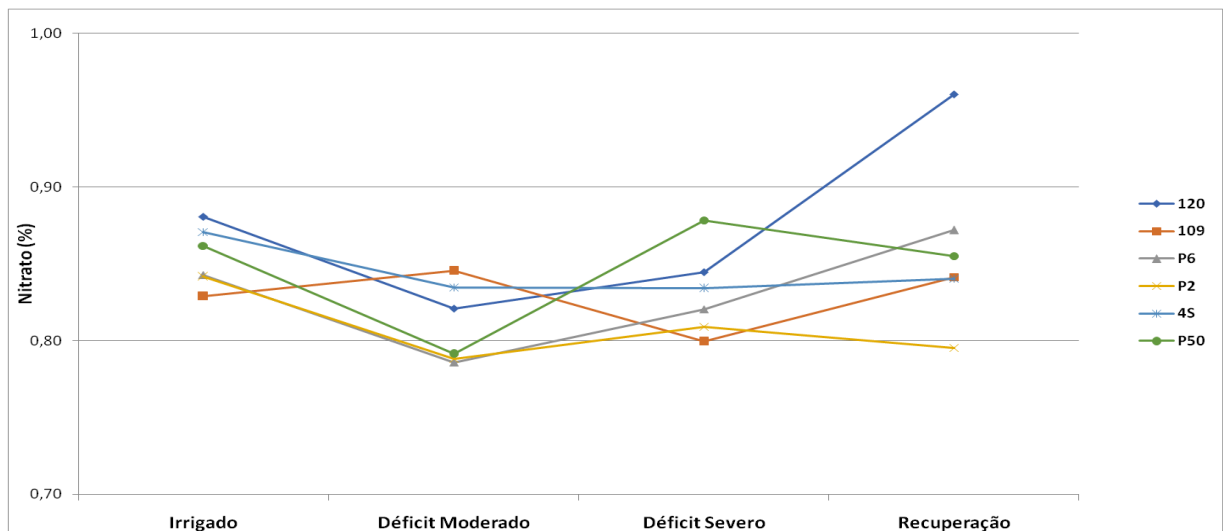


Figura 4: Efeitos da redução da irrigação na dosagem de nitrato nos genótipos de *C. canephora* nas diferentes etapas de déficit hídrico.

A avaliação do teor de nitrogênio orgânico apresentou diferenças significativas entre os genótipos testados, nas distintas condições de déficit, tanto na condição irrigado quanto na condição de déficit. Sob déficit moderado os genótipos 120 (3,10), 3T (2,70), 7T (2,69), 4S (2,65), 1T (2,97), 6T (2,95), 44S (3,00) e P59 (3,17) apresentaram médias superiores aos demais genótipos quando em déficit. Na avaliação do déficit severo ocorreu diferença significativa, sendo que os genótipos 120 (2,43), P6 (2,41), 7T (2,56), 4S (2,52), P40 (2,44), 44S (2,43) e P59 (2,61) apresentaram médias superiores aos demais genótipos quando em déficit. Na recuperação não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Média do teor de nitrogênio orgânico (%) em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.

Tratamentos	Genótipos														
	120	109	3T	P6	7T	P2	4S	P10	1T	6T	P50	P40	44S	P59	
Moderado	Irigado	2,30 b	3,06 a	2,12 b	2,36 b	2,44 b	2,49 b	2,14 b	2,37 b	2,77 a	2,43 b	2,65 a	2,41 b	2,47 b	2,37 b
	Déficit	3,10 a*	2,38 b*	2,70 a*	2,22 b	2,69 a	2,16 b	2,65 a*	2,25 b	2,97 a	2,95 a*	2,44 b	2,29 b	3,00 a*	3,17 a*
Severo	Irigado	2,06 c	3,00 a	2,39 b	2,38 b	2,03 c	2,23 c	2,81 a	2,32 b	2,46 b	2,30 b	2,51 b	1,95 c	2,21 c	2,22 c
	Déficit	2,43 a*	2,15 b*	2,07 b*	2,41 a	2,56 a*	2,19 b	2,52 a*	2,39 b	2,32 b	2,20 b	2,00 b*	2,44 a*	2,43 a	2,61 a*
Recuperação	Irigado	2,82 a	2,90 a	1,94 b	3,02 a	2,66 a	2,38 b	2,64 a	3,10 a	2,34 b	2,50 a	2,24 b	2,56 a	2,85 a	2,09 b
	Déficit	2,58 a	2,15 a*	2,49 a*	2,40 a*	2,61 a	2,44 a	2,25 a	2,20 a*	2,59 a	2,17 a	2,13 a	2,25 a	2,82 a	2,31 a

Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições.

Na condição de déficit moderado demonstram-se diferenças significativas nos genótipos 120 (3,10), 3T (2,70), 4S (2,65), 6T (2,95), 44S (3,00) e P59 (3,17), com aumento nos teores quando comparados aos respectivos controles irrigados, sendo que a maior concentração foi observada no genótipo P59 (3,17). O genótipo 109 (2,38) foi o único que apresentou redução significativa na concentração de nitrogênio orgânico na condição de déficit hídrico (Figura 5). De acordo com Ronchi; Damatta (2007) é possível observar que o genótipo 109, possui controle deficiente da transpiração, com seus estômatos respondendo de forma limitada à falta de água, o que pode afetar seus processos fisiológicos levando a alterações metabólicas como no caso do nitrogênio.

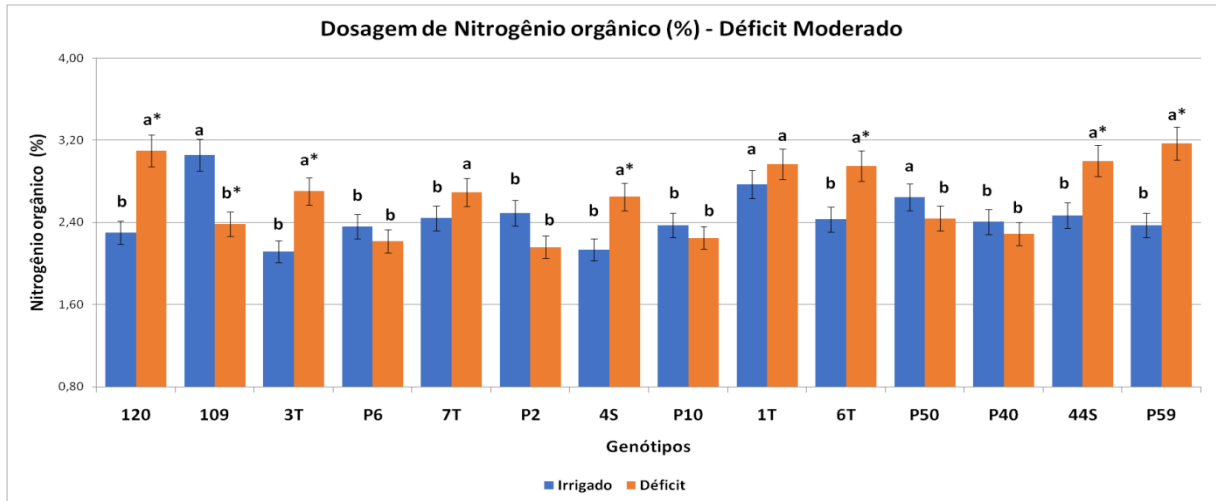


Figura 5: Dosagem de nitrogênio orgânico em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico moderado. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

Quando em déficit hídrico severo, os genótipos 120 (2,43), 7T (2,56), P40 (2,44) e P59 (2,61) responderam com aumento significativo nos teores de nitrogênio orgânico quando comparados aos respectivos controles irrigados. Os genótipos 109 (2,15), 3T (2,07), 4S (2,52) e P50 (2,00) apresentaram redução na concentração na condição de déficit hídrico (Figura 6).

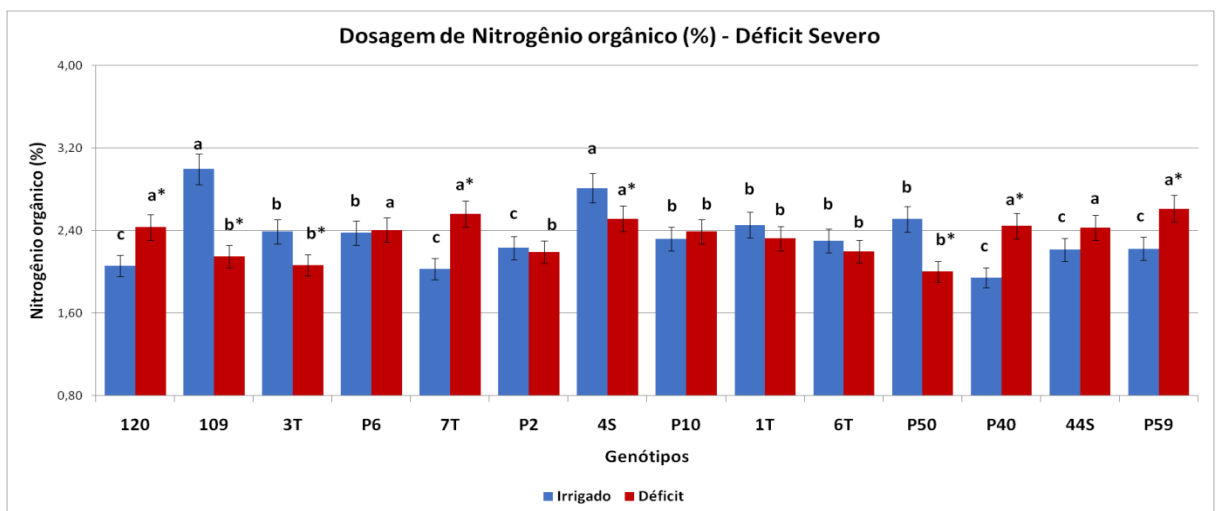


Figura 6: Dosagem de nitrogênio orgânico em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico severo. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

O genótipo 3T (2,49) apresentou aumento significativo nos teores de nitrogênio orgânico quando comparado ao respectivo controle irrigado, na condição de recuperação. Os genótipos 109 (2,15), P6 (2,40) e P10 (2,20) apresentaram redução na concentração de nitrogênio orgânico quando comparado ao irrigado (Figura 7).

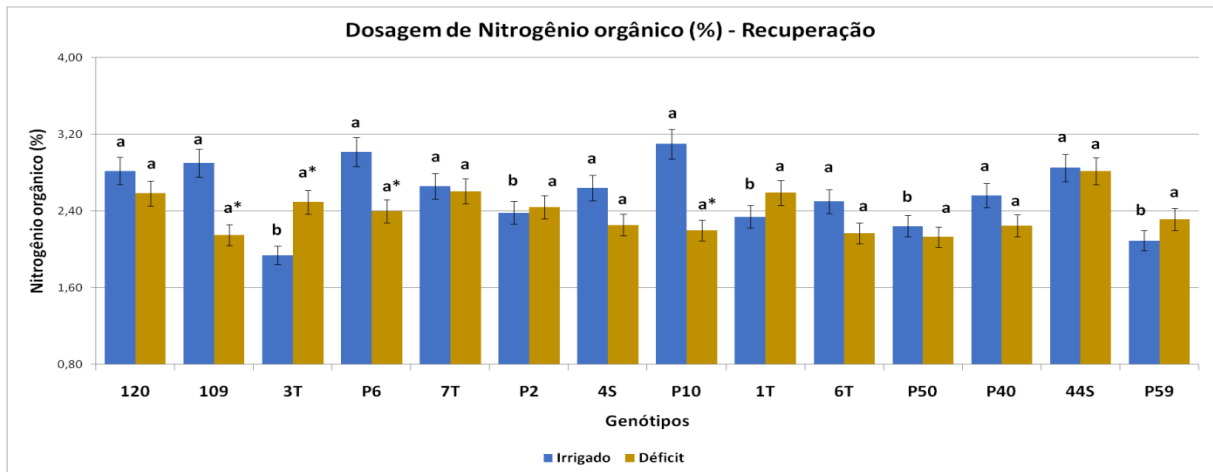


Figura 7: Dosagem de nitrogênio orgânico em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e recuperação. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

Meng et al. (2016) observaram que o estresse hídrico aumentou a proporção de NH_4^+ em relação ao NO_3 nas plantas. Esse aumento pode ter ocorrido devido aos baixos requisitos de energia do nitrogênio orgânico em relação ao NO_3 . Estes dados estão de acordo com o que observamos quando comparamos o conteúdo de nitrogênio orgânico nos genótipos com diferenças significativas nos diferentes momentos de estresse havendo maior acúmulo do mesmo em alguns genótipos quando comparados os resultados de nitrato (Figuras 4 e 8).

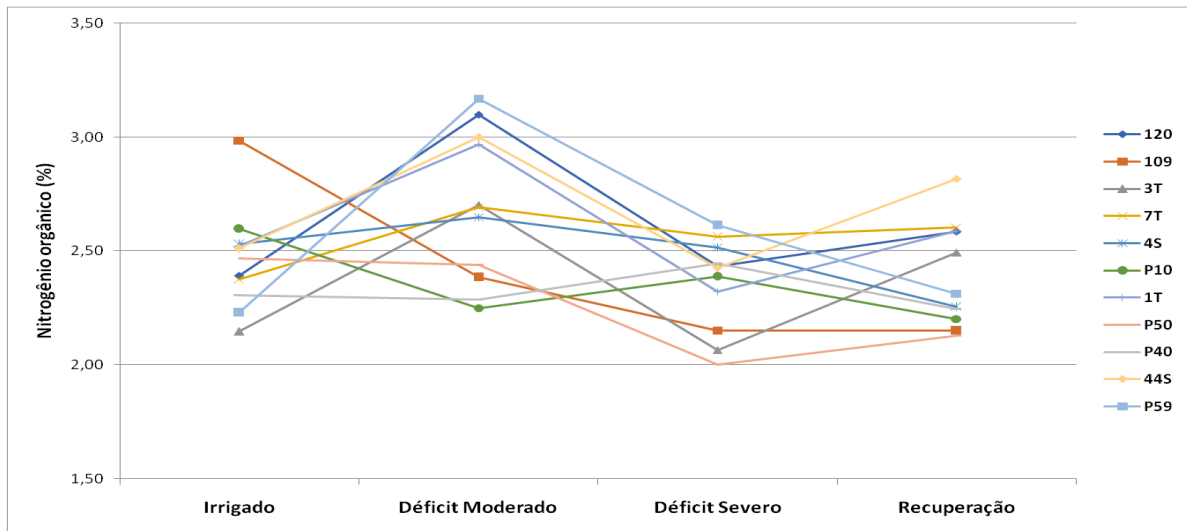


Figura 8: Efeitos da redução da irrigação na dosagem de nitrogênio orgânico nos genótipos de *C. canephora* nas diferentes etapas de déficit hídrico.

Os genótipos 120, 3T, 44S e P59 se mostraram mais promissores com relação à resposta à seca, visto que apresentaram aumento no teor de nitrogênio orgânico nas condições de déficit, o que parece ter contribuído para manter seus processos metabólicos, fazendo com que apresentassem bons resultados na fase de recuperação, com teores similares ou superiores aos controles irrigados. O genótipo 109, no entanto apresentou redução significativa tanto no déficit moderado, quanto no severo, não conseguindo se recuperar de forma tão eficiente na reidratação (Figura 8).

Analisando o comportamento dos genótipos que apresentaram diferenças significativas nos diferentes estágios de déficit hídrico é possível observar que com relação ao conteúdo de nitrato, os genótipos 120, P6 e P50 independente das variações ocorridas no déficit moderado e severo, conseguiram se recuperar do estresse atingindo valores semelhantes à condição irrigada. Destaca-se o genótipo 120, já caracterizado como tolerante à seca, que o teor de nitrato se mostrou bem superior na fase de recuperação (Figura 4). Em contrapartida os genótipos P2 e 109 tiveram seus níveis de nitrato mais afetados pela seca, o que não foi plenamente recuperado na fase de reidratação (Figura 4). Para as dosagens de nitrogênio orgânico, os genótipos que apresentaram maior capacidade de recuperação foram os genótipos P59, 120, 3T e 44S, em oposição aos genótipos 109, 4S, P50 e P10 onde os níveis de NH_4^+ foram inferiores aos apresentados na condição de irrigado (Figura 8).

A disponibilidade de água é um fator determinante para o metabolismo de compostos nitrogenados. Em condições de seca, a absorção de NH_4^+ e/ou NO_3^- em muitas espécies vegetais é frequentemente reduzida, provavelmente devido à limitação energética para a assimilação desses nutrientes (HUANG et al., 2018). Enquanto a suplementação de NH_4^+ pode mitigar os efeitos negativos da seca no crescimento e desenvolvimento de algumas espécies vegetais, como o arroz (*Oryza sativa*) (GUO et al., 2008), o NO_3^- é o determinante mais importante da tolerância à seca em outras espécies (HOULTON et al., 2008; WANG; MACKO, 2011).

Quando há escassez de água, os estômatos das plantas são fechados, o que pode causar um acúmulo de energia de excitação no cloroplasto. A disponibilidade adequada de nitrogênio pode desencadear mecanismos de fotoproteção do cloroplasto e alterações qualitativas da membrana com excesso de energia de excitação, que podem atuar indiretamente nos mecanismos de tolerância à seca (DAMATTA; RAMALHO, 2006).

Os resultados apresentados demonstram que nas condições experimentais analisadas, a exposição ao déficit hídrico afetou mais as concentrações de nitrogênio orgânico nas plantas do que de nitrato nas respostas dos genótipos.

6.3.2. Análise de prolina

Os resultados da análise de prolina na condição de déficit moderado demonstraram diferenças significativas entre os genótipos em déficit, onde os genótipos 120 (4,56), 7T (3,30) e 44S (3,96) apresentaram as maiores médias no déficit. Não ocorreram diferenças significativas na comparação entre os genótipos no déficit severo e na recuperação (Tabela 3).

Tabela 3. Média do teor de prolina em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.

		Prolina ($\mu\text{mol/g}$)													
Tratamentos		Genótipos													
		120	109	3T	P6	7T	P2	4S	P10	1T	6T	P50	P40	44S	P59
Moderado	Irrigado	1,07 c	3,61 b	1,97 c	4,35 a	2,39 c	3,32 b	3,46 b	2,00 c	5,80 a	2,29 c	6,22 a	3,12 b	1,11 c	1,64 c
	Déficit	4,56 a*	1,87 b*	2,49 b	1,72 b*	3,30 a	1,47 b	1,89 b*	1,22 b	2,08 b*	1,80 b	2,26 b*	2,08 b	3,96 a*	2,00 b
Severo	Irrigado	3,03 a	1,46 a	3,13 a	2,37 a	1,51 a	4,48 a	3,86 a	1,60 a	3,16 a	1,36 a	2,21 a	2,72 a	1,07 a	1,82 a
	Déficit	2,60 a	4,26 a*	3,48 a	4,01 a*	3,04 a*	3,33 a	4,41 a	2,57 a	4,00 a	3,88 a*	4,04 a*	5,11 a*	3,26 a*	3,78 a*
Recuperação	Irrigado	5,33 a	3,53 a	1,86 a	4,19 a	1,87 a	2,33 a	2,94 a	2,67 a	2,01 a	1,38 a	1,52 a	3,37 a	2,58 a	4,28 a
	Déficit	4,26 a	3,67 a	2,26 a	3,64 a	4,83 a*	3,73 a	3,89 a	3,64 a	3,05 a	3,27 a*	4,01 a*	3,50 a	4,52 a	5,72 a

Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições.

Na condição de estresse moderado os genótipos 120 (4,56) e 44S (3,96) apresentaram aumento na concentração de prolina na condição de déficit hídrico, enquanto os genótipos 109 (1,87), P6 (1,72), 4S (1,89), 1T (2,08) e P50 (2,26) apresentaram redução dos teores na mesma condição (Figura 9). Estudos relataram acúmulo de prolina em diferentes condições de estresses abióticos, como seca (FURLAN et al., 2020), salinidade (DE FREITAS et al., 2019), estresse oxidativo (FORLANI et al., 2019) e irradiação UV (PARK et al., 2020), o que pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos como aumento na biossíntese de prolina e/ou diminuição de sua degradação (JIANG et al., 2020).

A prolina desempenha um papel importante na resposta das plantas à seca. Como um osmólito compatível, auxilia na manutenção do equilíbrio osmótico das células, reduzindo a desidratação. Como um protetor de proteínas, ajuda a manter a estrutura e função das proteínas sob estresse de seca, e como um sinalizador molecular, regula a expressão gênica durante situações de déficit hídrico (FURLAN et al., 2020).

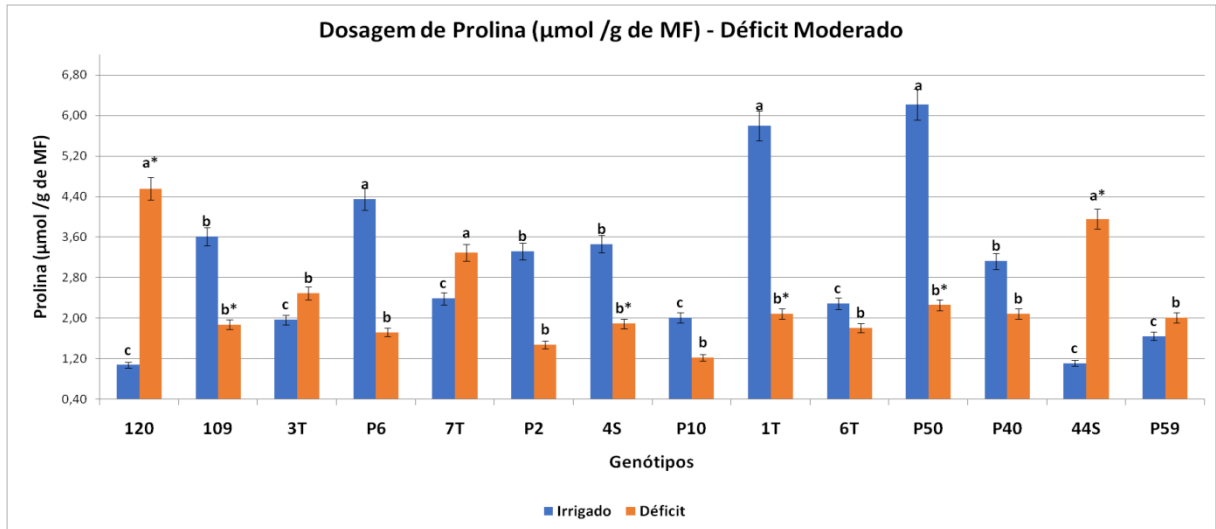


Figura 9: Dosagem de prolina em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico moderado. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

Na condição de déficit hídrico severo, os genótipos 109 (4,26), P6 (4,01), 7T (3,04), 6T (3,88), P50 (4,04), P40 (5,11), 44S (3,26) e P59 (3,78) tiveram aumento significativo na concentração de prolina nas folhas (Figura 10), o que sugere a adoção de mecanismos osmorreguladores em resposta à progressão do déficit hídrico. Resultados da pesquisa de Adamipour (2020) mostraram que a prolina é acumulada em grande quantidade em diferentes espécies de rosa quando expostas a condições de seca ativando mecanismos osmorreguladores que auxiliariam a planta a tolerar a condição estressante, além de demonstrarem aumento da expressão de genes envolvidos na biossíntese de prolina.

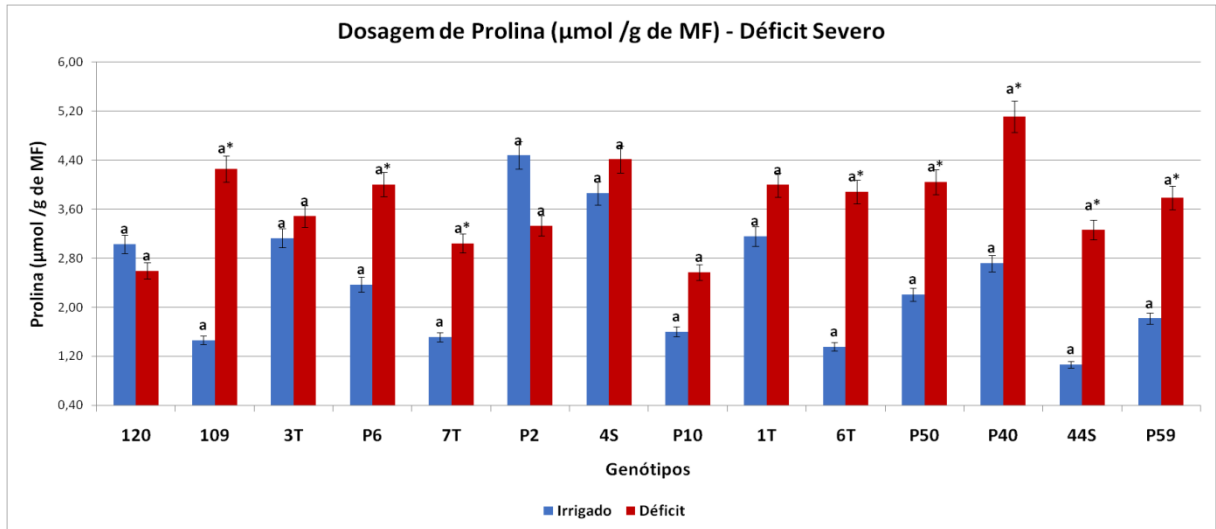


Figura 10: Dosagem de prolina em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico severo. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

Guo et al. (2018) estudando variedades de trigo tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico demonstraram um expressivo aumento da concentração de prolina nos indivíduos tolerantes, associado com aumento nas características de produtividade nestes indivíduos possivelmente devido aos mecanismos protetores desencadeados pela presença da prolina. Padrões semelhantes foram observados em genótipos de *Hordeum vulgare* (cevada), conforme exposto por Bandurska et al. (2017), e em cultivares de amendoim com tolerância contrastante à seca, onde observou-se aumento na expressão de genes associados às vias de degradação da prolina, enquanto que nos genótipos tolerantes ocorreu aumento significativo de genes de biossíntese da prolina (FURLAN et al., 2020).

Na avaliação da condição de recuperação os teores de prolina permaneceram maiores do que na condição irrigada nos genótipos 7T (4,83), 6T (3,27) e P50 (4,01) (Figura 11), nos demais genótipos estas diferenças não foram significativas, o que pode indicar que no geral as plantas conseguiram se recuperar dos efeitos das condições estressantes sofridas.

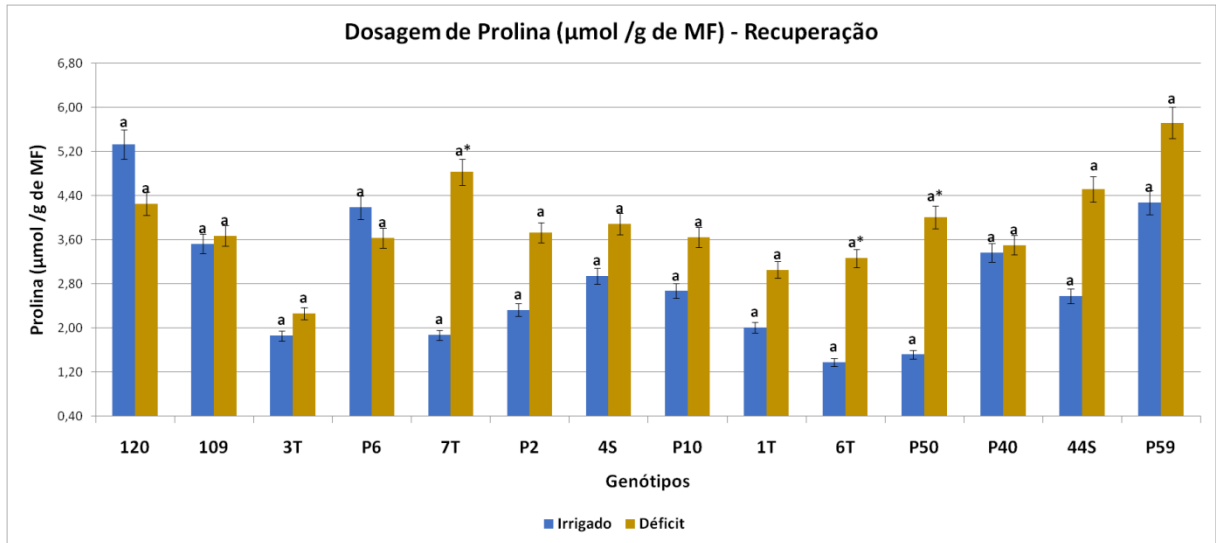


Figura 11: Dosagem de prolina em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e recuperação. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

Há abundantes evidências mostrando que a prolina acumulada sob seca ou aplicada de forma exógena afeta a tolerância ao estresse em diversas espécies através do alívio do tecido desidratado (TAMIRAT, 2019), bem como a proteção das membranas celulares e enzimas do efeito nocivo da desidratado (BANDURSKA et al., 2017; GUO et al., 2018; FURLAN et al., 2020; LAURIE et al., 2022). Segundo Hemaprabha et al. (2013), após o período de estresse, a prolina acumulada, pode ser usada como fonte de energia, com a redistribuição de nitrogênio e carbono, para a recuperação de atividades fisiológicas na planta. Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de pinhão manso submetidas à seca severa (SILVA, 2013).

Liu et al. (2021) demonstrou expressivo aumento dos níveis de prolina especialmente quando *Phedimus aizoon* L. foi submetido a estresse hídrico moderado e severo, correlacionando este aumento junto com outros osmólitos e metabólitos à maior tolerância da planta contra danos provocados pelo estresse exatamente por manter os processos osmóticos em funcionamento regular. Sob estresse hídrico, as plantas acumulam ativamente substâncias reguladoras como a prolina, com o intuito de aumentar a concentração de fluido celular, mantendo o turgor da célula, além de equilibrar a infiltração do protoplasma e do ambiente

externo, possibilitando assim, que diversos processos fisiológicos permaneçam em funcionamento.

Em estudos com batata doce (*Ipomoea batatas*) foi possível distinguir e obter diferenças significativas entre os genótipos com relação ao conteúdo de prolina com aumento de cerca de 5 vezes nas plantas caracterizadas como tolerantes na condição de estresse severo, quando comparados com os controles (LAURIE et al., 2022). Tal aumento ocorreu por meio do transporte de prolina livre do sistema radicular com o objetivo de garantir a manutenção de mecanismos osmorreguladores, fazendo da prolina um potencial marcador de estresse hídrico e de tolerância em plantas.

Lima et al. (2002) e Anim-Kwapong et al. (2011) relataram a existência de grande diversidade entre genótipos de *C. canephora* em todo o mundo para tolerância à seca, com efeitos fisiológicos e bioquímicos bem característicos. Anim-Kwapong et al. (2011) demonstrou através da análise de diferentes genótipos que a prolina pode ser um indicador útil para a seleção de genótipos de café robusta com alta produtividade e estabilidade da safra.

Tesfaye et al. (2014) utilizando clones de *C. canephora* observou que as trocas gasosas foliares foram afetadas pela seca do solo, com redução na taxa de fotossíntese e aumento na taxa de transpiração. O acúmulo de prolina aumentou significativamente à medida que o solo ficava mais seco, indicando que as plantas estavam respondendo ao estresse ambiental, produzindo mais prolina como uma estratégia para proteger suas células dos efeitos nocivos da seca. Tal fato está de acordo com os resultados apresentados onde observamos aumento expressivo dos níveis de prolina, especialmente durante o estresse hídrico severo, o que sugere a adoção de mecanismos protetores na planta (Figura 10). Tal fato também é descrito por Souza-Sobreira (2017) que demonstrou que progênies de *C. canephora* que apresentaram as melhores características morfofisiológicas como área foliar, taxa de fotossíntese e condutância estomática, quando submetidos a déficit hídrico, também apresentaram aumento significativo nos teores de prolina.

Escobar et al. (2017) utilizou as concentrações de prolina em experimento com déficit hídrico para determinar o potencial de tolerância à seca em diferentes genótipos de *C. canephora* da variedade robusta. Resultados semelhantes foram observados por Maestri et al. (1995) em *C. arabica* e *C. canephora*.

De acordo com o exposto pode-se inferir que em resposta à seca, muitos genótipos responderam com mecanismos relacionados à osmorregulação, dado o aumento na concentração de prolina nas condições de seca moderada e/ou severa. Cabe destacar que tais mecanismos mostraram-se eficazes visto que todos apresentaram bons resultados na fase de recuperação. A alta concentração de prolina pode ter contribuído para uma menor perda de água nos tecidos, mantendo uma boa assimilação de CO₂ nos estômatos, com bons rendimentos fotossintéticos. Os genótipos 120 e 44S apresentaram os potenciais de recuperação mais promissores.

6.3.3. Análise de Compostos Fenólicos

As diferenças entre os genótipos avaliados para as análises de compostos fenólicos não foram significativas em nenhuma das condições experimentais testadas (Tabela 4).

Na condição de déficit hídrico moderado, os genótipos P6 (1,46) e 1T (1,63) apresentaram aumentos significativos no teor de compostos fenólicos totais quando comparados aos controles irrigados (Figura 12). A acumulação de compostos fenólicos é crucial para neutralizar os impactos negativos do estresse hídrico em diversas espécies de plantas (SHARMA et al., 2019). Chung et al. (2016) identificaram que o déficit hídrico causou um aumento no teor de compostos fenólicos totais em *Rehmannia glutinosa*, assim como observado em *Melissa officinalis* L. (KAUR et al., 2015). Nos genótipos 109 (1,26), 3T (1,09) e P50 (1,18) foi observada redução destes teores na condição de déficit (Figura 12; Tabela 4).

Tabela 4. Média do teor de compostos fenólicos (%) em genótipos de *Coffea canephora* sob diferentes condições de estresse hídrico.

Compostos fenólicos (%)

Tratamentos	Genótipos														
	120	109	3T	P6	7T	P2	4S	P10	1T	6T	P50	P40	44S	P59	
Moderado	Irrigado	1,25 a	1,40 a	1,45 a	1,13 a	1,26 a	1,20 a	1,35 a	1,27 a	1,36 a	1,30 a	1,67 a	1,26 a	1,33 a	1,19 a
	Déficit	1,22 a	1,26 a*	1,09 a*	1,46 a*	1,28 a	1,05 a	1,24 a	1,08 a	1,63 a*	1,27 a	1,18 a*	1,11 a	1,21 a	1,16 a
Severo	Irrigado	0,90 a	0,86 a	0,96 a	0,99 a	0,91 a	1,01 a	0,90 a	0,93 a	0,91 a	0,87 a	0,99 a	0,97 a	0,91 a	0,95 a
	Déficit	0,80 a	0,84 a	0,89 a	0,81 a*	0,82 a*	0,93 a	0,85 a	0,96 a	0,94 a	0,89 a	0,94 a	0,87 a*	0,86 a	0,80 a*
Recuperação	Irrigado	1,44 a	1,76 a	1,15 a	1,60 a	1,48 a	1,53 a	1,49 a	1,31 a	1,54 a	1,37 a	1,67 a	1,35 a	1,37 a	1,86 a
	Déficit	1,28 a	1,66 a	1,61 a*	1,52 a	1,43 a	1,35 a	1,48 a	1,45 a	1,17 a	1,51 a	1,36 a	1,29 a	1,30 a	1,54 a

Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições.

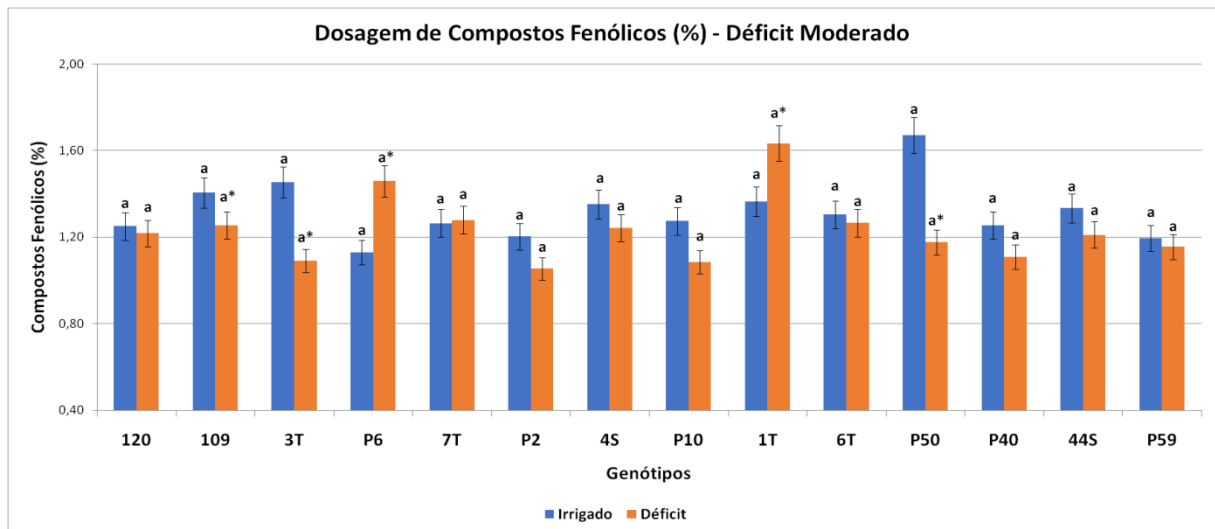


Figura 12: Dosagem de compostos fenólicos totais em folhas de plantas de café na condição de irrigação e déficit hídrico moderado. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

Quando em déficit severo os genótipos P6 (0,81), 7T (0,82), P40 (0,87) e P59 (0,80) apresentaram redução nos teores de compostos fenólicos quando comparados aos genótipos irrigados (Figura 13), semelhante ao observado por Rezayian et al. (2018). Na recuperação apenas o genótipo 3T (1,61) apresentou

aumento no teor de compostos fenólicos quando comparado ao controle irrigado (Figura 14).

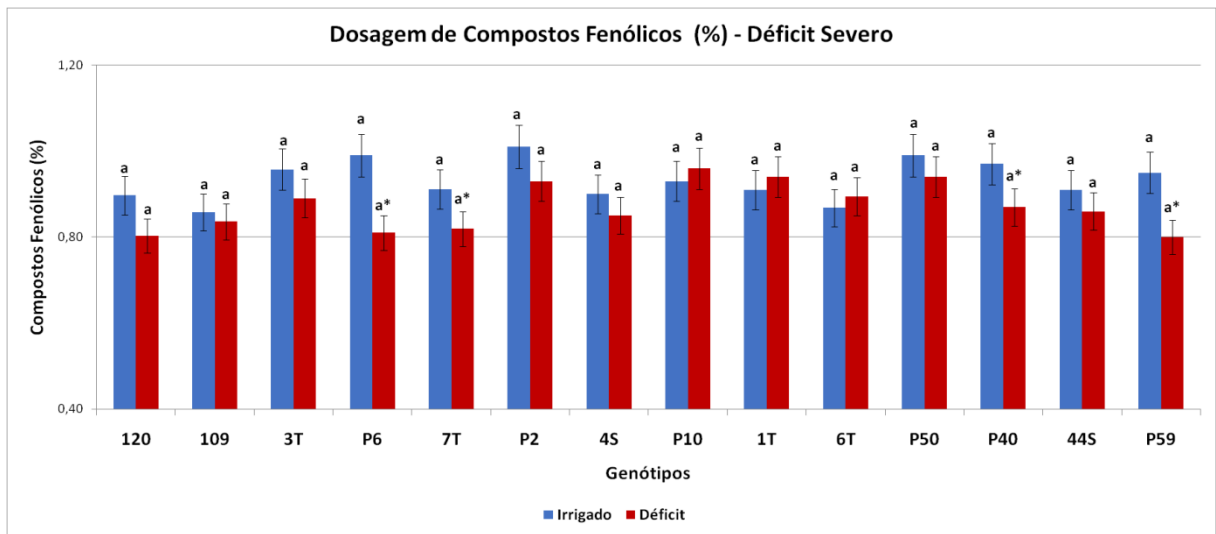


Figura 13: Dosagem de compostos fenólicos totais em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e déficit hídrico severo. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

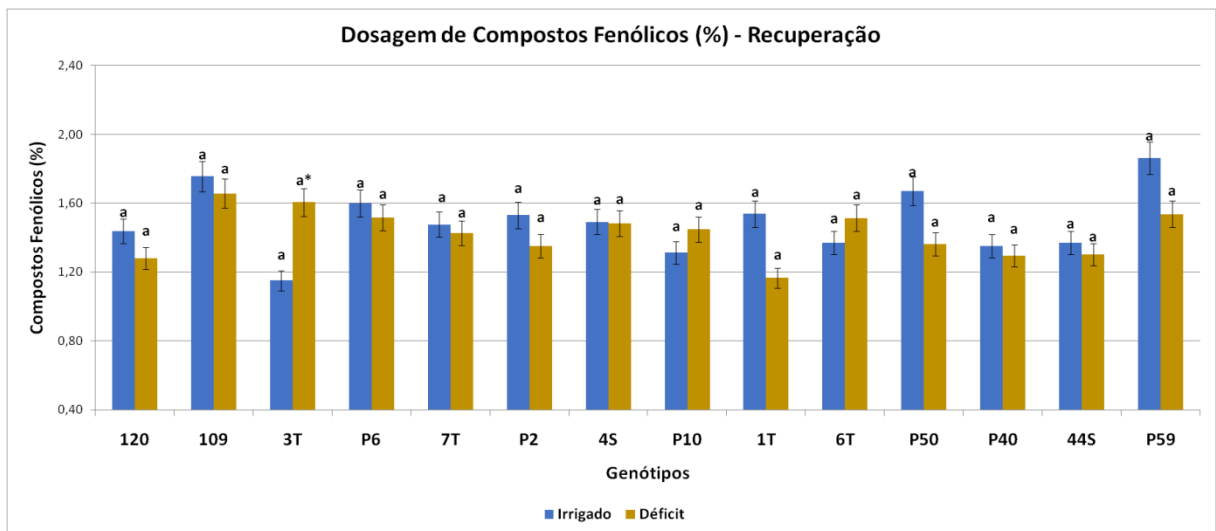


Figura 14: Dosagem de compostos fenólicos totais em folhas de plantas de cafeeiro na condição de irrigação e recuperação. Diferenças dentro de um mesmo genótipo e nível de estresse são indicadas por letras minúsculas diferentes (Scott-Knott $P < 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo genótipo e regime hídrico (Scott-Knott $P < 0,05$). Valores são a média de 4 repetições, barras representam o erro padrão da média.

As plantas possuem um sistema antioxidante eficiente para neutralizar as ROS. Esse sistema inclui enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase

(SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e glutathione redutase (GR), além de moléculas antioxidantes não enzimáticas, como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E) e compostos fenólicos.

As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos, combinadas com suas diversas propriedades químicas, atuam sinergicamente para proteger as células, sequestrando radicais livres e prevenindo danos oxidativos, além de atuar na manutenção da integridade das membranas celulares. (PARK et al., 2023).

Muitos trabalhos demonstraram o aumento na produção destes compostos nos tecidos vegetais quando submetidos a distintas condições de estresse como para *Achillea* spp. (GHARIBI et al., 2016), *Brassica napus* (REZAYIAN et al., 2018), *Ocimum* spp. (GHASEMI-PIRBALOUTI et al., 2017), *Thymus vulgaris* (KHALIL et al., 2018) e *Arabidopsis thaliana* (PEČINKA et al., 2023).

Os mecanismos de resposta à seca envolvem diversas alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares na planta. Em café, a exposição à seca provoca aumento de compostos fenólicos em folhas (CAVATTE et al., 2012), o que poderia contribuir de forma significativa para a proteção contra o excesso de energia.

Desta forma ao se analisar o comportamento dos genótipos que apresentaram alterações significativas nas distintas situações de déficit pode-se observar que os genótipos 120, 1T e P6 apresentaram aumento nos teores de compostos fenólicos na condição de estresse moderado, sinalizando a adoção de mecanismos de proteção para a planta, conforme destaca Sharma et al. (2019). Esses teores são reduzidos no estresse severo e aumentam novamente na reidratação para níveis próximos ou até superiores aos controles irrigados, mostrando maior capacidade de recuperação pós seca nestes genótipos (Figura 15).

Nas condições experimentais de déficit hídrico utilizadas, não se demonstrou maior participação dos mecanismos antioxidantes como resposta ao déficit, para os genótipos testados. Tais dados estão de acordo com o demonstrado por Souza-Sobreira (2017) onde o nível de compostos fenólicos não variou muito entre alguns grupos de genótipos testados.

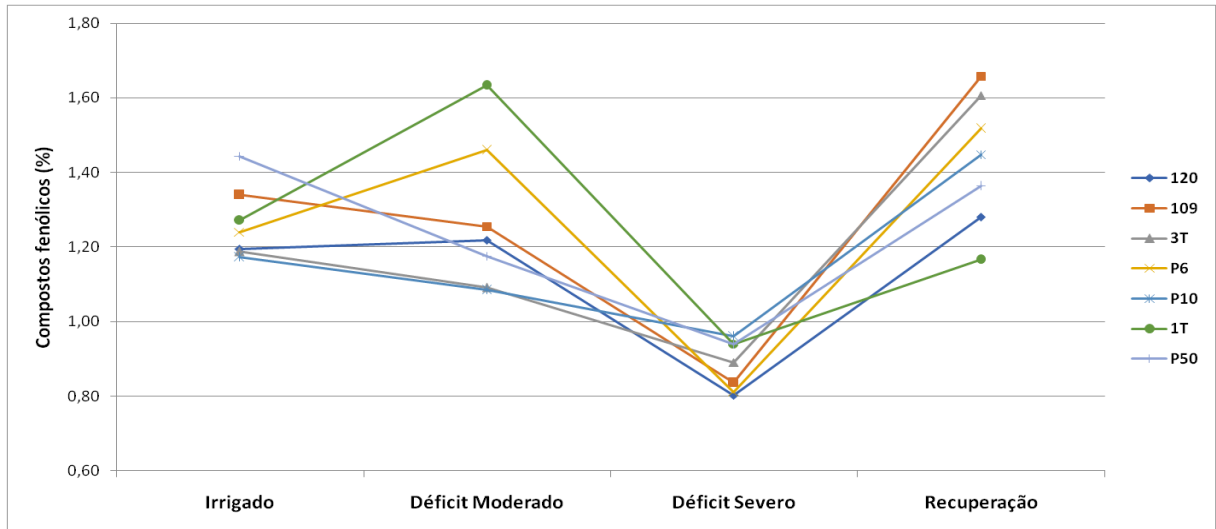


Figura 15: Efeitos da redução da irrigação na dosagem de compostos fenólicos nos genótipos de *C. canephora* nas diferentes etapas de déficit hídrico.

6.4. CONCLUSÕES

Diante o exposto nossos resultados demonstram que diversas respostas fisiológicas foram adotadas pelos diferentes genótipos no intuito de resistir aos danos provocados pela imposição do estresse hídrico. No geral não houve grandes variações entre os mesmos, sendo possível destacar o comportamento de alguns genótipos que mostraram características compatíveis com tolerância à seca associadas a algum parâmetro específico.

Com relação aos parâmetros bioquímicos utilizados destaca-se que os teores de nitrogênio orgânico e prolina apresentaram as maiores diferenças para os distintos genótipos testados, podendo ter potencial uso como marcadores de estresse hídrico. Os genótipos P59, 120, 3T e 44S apresentaram maior capacidade de recuperação quando avaliado o parâmetro de nitrogênio orgânico, em oposição aos genótipos 109, 4S, P50 e P10, cujas respostas não pareceram tão eficientes.

Com relação ao parâmetro prolina pode-se inferir que em resposta à seca, muitos genótipos responderam com mecanismos relacionados à osmorregulação, dado o aumento na concentração de prolina nas condições de seca moderada e/ou severa, onde os genótipos 120, 44S, 7T, 6T e P50 se mostraram mais promissores, com maiores potenciais de recuperação a estresse.

Analisando o comportamento dos genótipos que apresentaram diferenças significativas nos diferentes estágios de déficit hídrico é possível observar que com relação ao conteúdo de nitrato, os genótipos 120, P6 e P50 independente das

variações ocorridas no déficit moderado e severo, conseguiram se recuperar do estresse atingindo valores semelhantes à condição irrigada.

Os genótipos 120, 1T e P6 apresentaram aumento nos teores de compostos fenólicos na condição de estresse moderado, sinalizando a adoção de mecanismos de proteção para a planta. Destacam-se os resultados obtidos para o genótipo 120, já caracterizado como tolerante à seca, cujo perfil promissor pode ser confirmado para todos os parâmetros testados.

6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIPOUR, N.; KHOSH-KHUI, M.; SALEHI, H.; RAZI, H.; KARAMI, A.; MOGHADAM, A. Metabolic and genes expression analyses involved in proline metabolism of two rose species under drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 155, p. 105–113, 2020.

AL-SAMMARRAIE, O.N.A.; ALSHARAF, K.Y.; AL-LIMOUN, M.O.; KHLEIFAT, K.M.; AL-SARAYREH, S.A.; AL-SHUNEIGAT, J.M.; KALAJI, H.M. Effect of various abiotic stressors on some biochemical indices of *Lepidium sativum* plants. **Nature Scientific Reports**, v. 10, n. 21131, 2020.

ANIM-KWAPONG, E.; ANIM-KWAPONG, G.J.; ADOMAKO, B. Variation and association among characters genetically related to yield and yield stability in *Coffea canephora* genotypes. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**. v. 3, n. 12, p. 311–320, 2011.

BANDURSKA, H.; NIEDZIELA, J.; PIETROWSKA-BOREK, M.; NUC, K.; CHADZINIKOLAU, T.; RADZIKOWSKA, D. Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. **Plant Physiology et Biochemistry**, 2017.

BILEN, C.; EL CHAMI, D.; MEREU, V.; TRABUCCO, A.; MARRAS, S.; SPANO, D. A Systematic Review on the Impacts of Climate Change on Coffee Agrosystems. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 102, 2023.

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**, n. 144, p. 111-122, 2012.

CHUNG, P.J.; JUNG, H.; JEONG, D.H. Transcriptome profiling of drought responsive noncoding RNAs and their target genes in rice. **BMC Genomics**. v. 17, p. 563, 2016.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de café, Brasília, DF, v. 10, n. 1, jan. 2023

DAMATTA, F.M.; LOOS, R.A.; SILVA, E.A.; LOUREIRO, M.E.; DUCATTI, C. Effects of soil water deficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of pot-grown *Coffea canephora* Pierre. **Trees**. v. 16, p. 555–558, 2002.

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

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.

DAVIS, A.P.; GARGIULO, R.; FAY, M.F.; SARMU, D.; HAGGAR, J. Lost and Found: *Coffea stenophylla* and *C. affinis*, the Forgotten Coffee Crop Species of West Africa. **Frontiers in Plant Science**. v. 11, p. 616, 2020.

DE FREITAS, P.A.F.; DE CARVALHO, H.H.; COSTA, J.H.; DE SOUZA MIRANDA, R.; DA CRUZ SARAIVA, K.D.; DE OLIVEIRA, F.D.B.; COELHO, D.G.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Salt acclimation in sorghum plants by exogenous proline: physiological and biochemical changes and regulation of proline metabolism. **Plant Cell Reports**. v. 38, n. 3, p. 403–416, 2019.

ESCOBAR, A.O.Q.; DONJUAN, L.I.; LÓPEZ, I.M.; BÁEZ, M.A. Characterization of elite *Coffea canephora* genotypes for its tolerance to drought. **Agronomia Mesoamericana** v. 28, n. 1, p. 183-198, 2017.

FORLANI, G.; TROVATO, M.; FUNCK, D.; SIGNORELLI, S. Regulation of proline accumulation and its molecular and physiological functions in stress defence. In: Hossain, M.; Kumar, V.; Burritt, D.; Fujita, M.; Mäkelä, P. (Eds.), *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants*. **Springer**, p. 73–97, 2019.

FURLAN, A.L.; BIANUCCIA, E.; GIORDANOB, W.; CASTRO, S.; BECKER, D.F. Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 151, p. 566–578, 2020.

GHARIBI S.; TABATABAEI B.E.; SAEIDI G.; GOLI S.A. Effect of Drought Stress on Total Phenolic, Lipid Peroxidation, and Antioxidant Activity of Achillea Species. **Appl. Biochem. Biotechnol**. v. 178, p.796–809, 2016.

GHASEMI, A.P.; MALEKPOOR F.; SALIMI A.; GOLPARVAR A. Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. **Scientia Horticulturae**. v. 217, p. 114–122, 2017.

GLOSER, V.; DVORACKOVA, M.; MOTA, D.H.; PETROVIC, B.; GONZALEZ, P.; GEILFUS, C.M. Early Changes in Nitrate Uptake and Assimilation Under Drought in Relation to Transpiration. **Frontiers in Plant Science**. v. 11, n. 602065, 2020.

GONZALEZ-DUGO, V.; ZARCO-TEJADA, P.J.; BERNI, J.A.J.; SUAREZ, L.; GOLDHAMER, D.A.; FERERES, E. Almond tree canopy temperature reveals intra-crown variability that is water stress-dependent. **Agricultural and Forest Meteorology**. v. 154, p. 156–165, 2012.

GUO, S.W.; ZHOU, Y., LI, Y., GAO, Y., SHEN, Q., 2008. Effects of different nitrogen forms and osmotic stress on water use efficiency of rice (*Oryza sativa*). **Annals of Applied Biology**. v. 153, p. 127–134, 2008.

GUO, R.; SHI, L.X.; JIAO, Y.; LI, M.X.; ZHONG, X.L.; GU, F.X.; LIU, Q.; XIA, X.; LI, H.R. Metabolic responses to drought stress in the tissues of drought-tolerant and drought-sensitive wheat genotype seedlings. **AoB PLANTS** v. 10, n. 16, 2018.

HEMAPRABHA, G.; SWAPANA, S.; LAVANYA, D. L.; SAJITHA, B.; VENKATARAMANA, S. Evaluation of Drought Tolerance Potential of Elite Genotypes and Progenies of Sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids). **Sugar Tech**, v. 15, n. 1, p. 9–16, 2013.

HOSSAIN, A.; SAGAR MAITRA, S.; PRAMANICK, B.; BHUTIA, K.L.; AHMAD, Z.; MOULIK, D.; SYED, M.A.; SHANKAR, T.; ADEEL, M.; HASSAN, M.M.; AFTAB, T. Chapter 22 - Wild relatives of plants as sources for the development of abiotic stress tolerance in plants. *Plant Perspectives to Global Climate Changes. Developing Climate-Resilient Plants*. p. 471-518, 2022.

HOULTON, B.Z.; SIGMAN, D.M.; SCHUUR, E.A.G.; HEDIN, L.O. A climate-driven switch in plant nitrogen acquisition within tropical forest communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 104, p. 8902–8906, 2007.

HUANG, L.; LI, M.; ZHOU, K.; SUN, T.; HU, L.; LI, C.; MA, F. Uptake and metabolism of ammonium and nitrate in response to drought stress in *Malus prunifolia*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 127, p. 185–193, 2018.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. Working group III. Mitigation of Climate Change. p. 99, 2014. In: PARTELLI, F. L.; BONOMO, R. *Café Conilon: o clima e manejo da planta*. Alegre, ES: CAUFES, 2016.

JIANG, W.; WU, Z.; WANG, T.; MANTRI, N.; HUANG, H.; LI, H.; TAO, Z.; GUO, Q. Physiological and transcriptomic analyses of cadmium stress response in *Dendrobium officinale* seedling. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 148, p. 152–165, 2020.

KAUR L.; ZHAWAR V.K. Phenolic parameters under exogenous ABA, water stress, salt stress in two wheat cultivars varying in drought tolerance. **Indian Journal of Plant Physiology**. v. 20, p. 151–156, 2015.

KHALIL, N.; FEKRY, M.; BISHR, M.; EL-ZALABANI, S.; SALAMA, O. Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 123, n. 65–74, 2018.

- KISHOR, K.P.B.; SREENIVASULU, N. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? **Plant Cell Environ.** v. 37, p. 300-311, 2014.
- LAURIE, S.M.; BAIRU, M.W.; LAURIE, R.N. Analysis of the Nutritional Composition and Drought Tolerance Traits of Sweet Potato: Selection Criteria for Breeding Lines. **Plants.** v. 11, p. 1804, 2022.
- LIMA, A.L.S.; DAMATTA, F.M.; PINHEIRO, H.A.; 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.
- LIU, Y.; HE, Z.; XIE, Y.; SU, L.; ZHANG, R.; WANG, H.; LI, C.; LONG, S. Drought resistance mechanisms of *Phedimus aizoon* L. **Scientific Reports.** v. 11, n. 13600, 2021.
- MAESTRI, M.; DAMATTA, F.M.; REGAZZI, A.J.; BARROS, R.S Accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in mature leaves of water stressed coffee plants (*Coffea arabica* and *C. canephora*), **Journal of Horticultural Science**, v. 70, n. 2, p. 229-233, 1995.
- MELO, E.F. Modificações ecofisiológicas, bioquímicas e anatômicas em cafeeiro progênie siriema sob deficiência hídrica. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, 2008.
- MENG, S.; ZHANG, C.X.; SU, L.; LI, Y.M.; ZHAO, Z. Nitrogen uptake and metabolism of *Populus simonii* in response to PEG-induced drought stress. **Environmental and Experimental Botany.** v. 123, p. 78–87, 2016.
- NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-S.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science.** v.5, p. 170, 2014.
- PARK, M.H.; PARK, C.H.; SIM, Y.B.; HWANG, S.J. Response of *Scenedesmus quadricauda* (chlorophyceae) to salt stress considering nutrient enrichment and intracellular proline accumulation. **International Journal of Environmental Research and Public Health.** v. 17, n. 10, p. 3624, 2020.
- PARK, Y.J.; KWON, D.Y.; KOO, S.Y.; TRUONG, T.Q.; HONG, S.C.; CHOI, J.; MOON, J.; KIM, S.M. Identification of drought-responsive phenolic compounds and their biosynthetic regulation under drought stress in *Ligularia fischeri*. **Frontiers in Plant Science.** v. 14, n. 1140509, 2023.
- PEČINKA, P.; BOHÁLOVÁ, N.; VOLNÁ, A.; KUNDRÁTOVÁ, K.; BRÁZDA, V.; BARTAS, M. Analysis of G-Quadruplex-Forming Sequences in Drought Stress-Responsive Genes, and Synthesis Genes of Phenolic Compounds in *Arabidopsis thaliana*. **Life (Basel).** v. 13, n. 1, p. 199, 2023.
- RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; LIDON, F.C.; MARQUES, L.M.C.; LEITAO, A.E.; FORTUNATO, A. S. Stress cross-response of the antioxidative system

promoted by superimposed drought and cold conditions in *Coffea* spp. **PLoS One** v. 13, 2018.

REZAYIAN M.; NIKNAM V.; EBRAHIMZADEH H. Differential responses of phenolic compounds of *Brassica napus* under drought stress. **Iranian Journal of Plant Physiology**. v. 8, p. 2417–2425, 2018.

RONCHI, C. P.; DAMATTA, F. M. Aspectos fisiológicos do café conilon. In: FERRÃO, G. F. et al. (Orgs.). *Café Conilon*. Vitória: Incaper, p. 94-119, 2007.

SHARMA, A.; SHAHZAD, B.; REHMAN, A.; BHARDWAJ, R.; LANDI, M.; ZHENG, B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. **Molecules**. v. 24, n. 13, p. 2452, 2019.

SILVA, L.D. Alterações fisiológicas e bioquímicas em genótipos de *Jatropha curcas* l. submetidos ao déficit hídrico. 114p. Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal, da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, 2013.

SONG, A.Y.; LIA, J.; LIUA, M.; MENGA, Z.; LIU, K.; SUI, N. Nitrogen increases drought tolerance in maize seedlings. **Functional Plant Biology**, 2019.

TAMIRAT, W. Review on Role of Proline on Coffee Under Drought Conditions. **Journal of Environment and Earth Science**. v. 9, n. 10, 2019.

TESFAYE, S.G.; ISMAIL, M.R.; RAMLAN, M.F.; MARZIAH, M.; KAUSAR, H. Effect of soil drying on rate of stress development, leaf gas exchange and proline accumulation in Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) clones. **Experimental agriculture**, v. 50, n. 3, p. 458-479, 2014.

WANG, L.; MACKO, S. Constrained preferences in nitrogen uptake across plant species and environments. **Plant Cell Environmental**. v. 34, p. 525–534, 2011.

XIA, H.; XU, T.; ZHANG, J.; SHEN, K.; LI, Z.; LIU, J. Drought-Induced Responses of Nitrogen Metabolism in *Ipomoea batatas*. **Plants**. v. 9, n. 1341, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com as análises moleculares realizadas foi possível observar a expressão diferencial dos genes nas distintas condições de déficit a que os genótipos foram submetidos, sendo que os genes *CcMPR1* e *RBCS1* apresentaram potencial uso como marcadores de déficit hídrico.

Os genótipos 120, 6T, 1T, P50, P40, 7T, P2 e 4S foram os mais promissores com relação à expressão de *CcMPR1* indicando a adoção de estratégias de defesa em café por meio de mecanismos osmorreguladores.

Com relação à expressão *RBCS1* os genótipos 3T, P6 e 1T se destacaram ao apresentarem perfis de recuperação semelhantes ao observado no genótipo tolerante 120.

O potencial uso dos genes testados traz perspectivas de investigações futuras relacionadas à análise dos componentes integrantes das distintas vias metabólicas, as quais os respectivos genes estão associados, no intuito de maior caracterização dos mecanismos fisiológicos adotados em resposta à seca.

Com relação aos parâmetros bioquímicos utilizados destaca-se que os teores de nitrogênio orgânico e prolina apresentaram as maiores diferenças para os genótipos testados, podendo ter potencial uso como marcadores de estresse hídrico. Os genótipos P59, 120, 3T e 44S apresentaram maior capacidade de recuperação quando avaliado o parâmetro de nitrogênio orgânico, em oposição aos genótipos 109, 4S, P50 e P10, cujas respostas não pareceram tão eficientes.

Com relação ao parâmetro prolina pode-se inferir que em resposta à seca, muitos genótipos responderam com mecanismos relacionados à osmorregulação, onde os genótipos 120, 44S, 7T, 6T e P50 se mostraram mais promissores, com maiores potenciais de recuperação ao estresse.