

PAULO EDUARDO DE MENEZES SILVA

**ACLIMATAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA A CICLOS DE
DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM CLONES DE *Coffea canephora***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586a
2014
Silva, Paulo Eduardo de Menezes, 1986-
Aclimatação fisiológica e bioquímica a ciclos de deficiência
hídrica em clones de *Coffea canephora* / Paulo Eduardo de
Menezes Silva. – Viçosa, MG, 2014.
viii, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fábio Murilo DaMatta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.50-67.

1. Café. 2. *Coffea canephora*. 3. Café - Aclimatação. 4.
Café - Consumo de água. 5. Déficit hídrico. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa
de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 633.73


PAULO EDUARDO DE MENEZES SILVA

**ACLIMTAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA A CICLOS DE DEFICIÊNCIA
HÍDRICA EM CLONES DE *Coffea canephora***

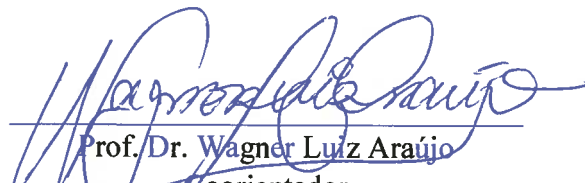
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 21 de agosto de 2014


Dra. Carla Quinhones Godoy Soares


Prof. Dr. Márcio Alves Ferreira


Prof. Dr. Adriano Nunes-Nesi


Prof. Dr. Wagner Luiz Araújo
Coorientador


Prof. Dr. Fábio Murilo DaMatta
Orientador

DEDICO

A Deus,

Aos meus pais (Elio e Rita),

Aos meus irmãos (Vinícius e João Pedro),

A minha namorada (Fernanda),

A todos os familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos concedidas ao longo de toda a minha vida acadêmica e, principalmente, durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais (Elio e Rita) e meus irmãos (Vinícius e João Pedro), por todo o incentivo e dedicação durante toda a minha vida acadêmica.

A minha namorada (Fernanda Farnese), por todo o apoio e carinho durante as horas de alegria e tristeza e por ter-me ensinado tanto em tão pouco tempo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade para a realização deste curso.

Ao professor Fábio Murilo DaMatta, pela orientação, amizade, apoio e, principalmente, pela dedicação durante todas as horas de que necessitei.

Aos grandes amigos Elias (Gordinho), Samuel (Samuca) e Alice, pelo companheirismo e ajuda ao longo da realização deste e de outros tantos trabalhos.

Aos amigos do grupo café: Mateus, Leandro, Filipe, Lillian, Kelly, Alicinha, Samuel, Elias, Martiele, Rafael, Júnior, Amanda, Rodrigo e Lucas, pelo apoio e ajuda incondicionais em todas as horas de trabalho, pela sincera amizade em todos os momentos e, também, por terem transformado Viçosa em um lugar tão bom de se viver.

A todos os colegas da Fisiologia Vegetal

Aos amigos do Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology: Toshihiro, Tamar, Saleh, Ina, Ilse, Gene, Igor, Danilo, Laise, Alexandre (Xandrinho), Asdrubal, Léo e Thiago.

Ao Dr. Alisdair Robert Fernie pela orientação e grandes ensinamentos durante meu período na Alemanha.

Aos meus coorientadores, Márcio Alves Ferreira e Wagner Luiz Araújo, pelas sugestões e ajuda durante todo o desenvolvimento desta tese.

Muito obrigado!

ÍNDICE

Resumo	vi
Abstract	vii
1 – Introdução.....	1
2 - Material e métodos.....	6
2.1 - Generalidades.....	6
2.2 - Relações hídricas.....	9
2.3 - Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	10
2.4 - Ensaio bioquímico e enzimático.....	11
2.4.1 - Determinação da concentração de carboidratos e aminoácidos	11
2.5.2 - Determinação dos níveis de nucleotídeos.....	11
2.5.3 - Perfil metabólico.....	11
2.5.4 - Enzimas do metabolismo do carbono.....	12
2.5.5 - Enzimas do metabolismo antioxidativo.....	12
2.5.6 - Danos celulares.....	12
2.5.7 - Análise estatística.....	12
3 - Resultados.....	13
3.1 - Relações hídricas.....	13
3.2 - Trocas gasosas.....	16
3.3 - Fluorescência da clorofila <i>a</i> e fotoproteção.....	18
3.4 - Carboidratos e aminoácidos.....	20
3.5 - Enzimas do metabolismo do carbono.....	22
3.6 - Sistema antioxidativo, danos celulares e estado redox.....	25
3.7 - Perfil metabólico.....	28
3.8 - Relações entre as variáveis.....	33
4 - Discussão.....	36
5 - Referências.....	50

RESUMO

SILVA, Paulo Eduardo de Menezes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Aclimação fisiológica e bioquímica a ciclos de deficiência hídrica em clones de *Coffea canephora***. Orientador: Fábio Murilo DaMatta. Coorientador: Wagner Luiz Araújo.

A aclimação diferencial ou, como vem sendo chamada, a memória ao estresse, é um processo que só recentemente foi mais bem caracterizado em plantas. Contudo, a grande maioria dos trabalhos aborda esse processo de forma fragmentada, centrando apenas na expressão de alguns genes ou em poucas respostas morfológicas. Diante desses fatos, um dos principais objetivos do presente trabalho foi apresentar uma visão integrada do processo de aclimação diferencial à seca, em dois clones de *C. canephora* com tolerância diferencial à seca (109 sensível à seca e 120, tolerante). Para tal, mudas com quatro pares de folhas, provenientes do enraizamento de estacas de ramos ortotrópicos, foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 24 dm³. Quando atingiram, aproximadamente, um ano, as plantas foram submetidas a regimes hídricos diferenciais: um grupo de plantas foi continuamente irrigado (plantas-controle), um segundo grupo de plantas foi submetido a apenas um ciclo de déficit hídrico (C1), enquanto um terceiro grupo foi submetido a três ciclos de estresse (C3). Cada ciclo de déficit hídrico consistiu de duas fases, uma de desidratação e outra, de reidratação. A desidratação foi feita mediante suspensão da irrigação, até que a umidade atingisse 25% da água disponível no solo, em relação à capacidade de campo. As plantas foram expostas ao déficit hídrico por um período de 14 dias quando, então, foram avaliados parâmetros fisiológicos e coletadas amostras para análises bioquímicas. Após as avaliações, as plantas foram reidratadas via elevação da umidade do solo à capacidade de campo (recuperação). Na condição irrigada, foi possível observar grande similaridade fisiológica e metabólica entre os dois clones, em praticamente todas as variáveis avaliadas. De modo geral, a seca promoveu grandes reduções na condutividade hidráulica foliar (K_F) que, por sua vez, levou a decréscimos da condutância estomática (g_s) e, conseqüentemente, da taxa de assimilação líquida de carbono (A), principalmente no clone 109. A análise de perfil metabólico revelou uma profunda reprogramação metabólica em ambos os clones, com aumento nos níveis de praticamente

todos os aminoácidos detectados, além de ácidos orgânicos e polióis. O aumento na biossíntese desses compostos esteve diretamente relacionado com o consumo de carboidratos (glicose, frutose, sacarose e amido) e com o aumento na atividade de enzimas da glicólise e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Vias alternativas de dissipação do excesso de energia de excitação (fotorrespiração e biossíntese de compostos secundários), além de mecanismos de remoção de radicais livres (enzimas do estresse oxidativo), também foram fortemente induzidas pela seca, em ambos os clones. A ação conjunta desses vários mecanismos de defesa foi capaz de mitigar os efeitos deletérios da redução da disponibilidade hídrica, evidenciado pela ausência de danos celulares (avaliados pela concentração de aldeído malônico) e de fotoinibição (avaliada pela eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II), além da manutenção do estado redox celular (razões NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) em todos os tratamentos, ressaltando, assim, a importância da integração metabólica nos processos de tolerância à seca. A análise de componentes principais revelou que as plantas do tratamento C3, de ambos os clones, tiveram comportamento distintos, em relação às plantas dos tratamentos C1. Com efeito, a maior parte dos ajustes induzidos pela seca foi mais aparente nas plantas do tratamento C3, de ambos os clones, em relação às plantas do tratamento C1, particularmente no clone 120. Uma vez que nas plantas C3 o aumento de A não esteve relacionado com K_F , é provável que o conjunto de respostas diferencialmente moduladas foi o responsável por garantir o melhor desempenho dessas plantas na seca, em relação às plantas que foram submetidas à seca apenas uma vez.

ABSTRACT

SILVA, Paulo Eduardo de Menezes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august, 2014. **Physiological and biochemical acclimation to drought cycles in clones of *Coffea canephora***. Adviser: Fábio Murilo DaMatta. Co-adviser: Wagner Luiz Araújo.

The differential acclimation, or how it has been called, the stress memory, is a process that only recently has been best characterized in plants. However, the vast majority of the studies addresses this process in a fragmented way, focusing only on the expression of some genes or few morphological responses. Given these facts, one of the main objectives of this study is to present an integrated view of the process of differential acclimation to drought in two clones of *C. canephora* with differential drought tolerance (clone 109 sensitive to drought and clone 120, tolerant). To this end, seedlings with four pairs of leaves were grown in a greenhouse in pots of 24 dm³. When reached approximately one year, the plants were subjected to differential water regimes: a group of plants was continuously irrigated (control plants), a second group of plants was subjected to one cycle of drought (C1), while a third group was subjected to three cycles of stress (C3). Each cycle consisted of two stages, the dehydration and rehydration. Dehydration was done by withholding water until the humidity reached 25% of the available water in the soil in relation to field capacity. The plants were exposed to water stress for a period of 14 days, at this point, physiological parameters were assessed and samples were collected for biochemical analysis. After the evaluations, the plants were rehydrated via elevation of soil moisture at field capacity (recovery). In irrigated condition, it was observed great physiological and metabolic similarity between the two clones in nearly all variables. In general, the drought promoted large reductions in leaf hydraulic conductivity (K_F), which in turn led to decreases in stomatal conductance (g_s) and, consequently, the rate of liquid carbon assimilation (A), especially in the clone 109. The metabolic profile analysis revealed a profound metabolic reprogramming in both clones with increased levels of practically all detected amino acids, organic acids and polyols. The increase in the biosynthesis of these compounds was directly related to the consumption of carbohydrates (glucose, fructose, sucrose and starch) and with the increase in the activity of enzymes of glycolysis and the tricarboxylic acid cycle. Alternative dissipative routes of excess excitation energy (photorespiration and biosynthesis of secondary metabolites), as well as mechanisms for removing free radicals (oxidative stress enzymes) were also strongly induced by drought in both clones. The joint action of these various mechanisms of defense was able to mitigate the

deleterious effects of reduced water availability, as evidenced by the absence of cell damage (assessed by malondialdehyde concentration) and photoinhibition (measured by the maximum photochemical efficiency of photosystem II), and the maintenance of cellular redox state (NAD^+ ratios / NADH and NADP^+ / NADPH) in all treatments. These results highlight the importance of the metabolic integration in the process of drought acclimation. The principal component analysis revealed that the plants of the treatment C3, in both clones, had different behavior when compared to plants of the treatment C1. In fact, most of the changes induced by drought was most apparent in the C3 treatment plants, in both clones, compared to C1 treatment plants, particularly in clone 120. Since the increase in A in the C3 plants was not related to K_F , it is likely that the set of differentially modulated responses was responsible for ensuring the best performance of these plants in the dry conditions, when compared to plants that were subjected to drought only once.

1- INTRODUÇÃO

Dentre todos os fatores bióticos e abióticos, o déficit hídrico é o principal fator ambiente a limitar o crescimento e a produtividade das culturas agrícolas em todo o mundo (Lichtenthaler, 1998; Chavez et al., 2008). Com efeito, os danos desencadeados pelo déficit hídrico podem ser superiores aos danos oriundos de todos os outros fatores bióticos e abióticos em conjunto (Lambers et al., 2008). Na cultura do café, por exemplo, em anos muito secos, a produtividade pode ser reduzida em até 80%, caso não seja adotada a irrigação (DaMatta e Ramalho, 2006). Em adição, diversos estudos prevêm uma maior ocorrência de eventos de déficit hídrico ao longo das próximas décadas (IPCC, 2007). Dessa forma, a capacidade de adaptação e aclimatação à baixa disponibilidade de água, bem como a capacidade de recuperação após períodos de desidratação, reveste-se de grande importância para o crescimento e a produtividade das culturas (Gallé e Feller, 2007).

A adaptação das plantas ao déficit hídrico é um mecanismo muito complexo, uma vez que envolve alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (Passioura, 1997). Uma resposta marcante de plantas submetidas à deficiência hídrica é a redução nas taxas transpiratórias. Esse processo envolve o fechamento estomático, com consequente redução da condutância estomática (g_s), que contribui sobretudo para o aumento ou para a manutenção do potencial hídrico dentro de limites que permitam a manutenção do crescimento vegetal (Tardieu, 2005). No entanto, a redução de g_s leva a um menor influxo de CO_2 para o interior dos cloroplastos (Epron e Dreyer, 1993; Cornic e Fresneau, 2002; Chaves e Oliveira, 2004; Flexaset al., 2004), causando reduções nas taxas fotossintéticas e, em última análise, contribuindo para um menor acúmulo de biomassa pela planta. Além de g_s , a condutância mesofílica (g_m) pode ser, também, grandemente limitada pela deficiência hídrica. De fato, reduções em g_s e g_m (difusivas) têm sido consideradas como os principais fatores limitantes do processo fotossintético nos estádios iniciais de deficiência hídrica (Cornic, 2000; Flexas et al., 2009; Gallé et al., 2011). Sob condições mais severas de déficit hídrico, reduções nas taxas fotossintéticas podem ocorrer devido à inibição de processos metabólicos específicos como, por exemplo, a fotofosforilação (Youniset al., 1979; Tezara et al., 1999), a capacidade de regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) (Giménez et al., 1992; Gunasekera e Berkowitz, 1993) e redução de

atividade da Rubisco e de outras enzimas envolvidas no ciclo de Calvin (Medrano et al., 1997; Maroco et al., 2002; Parry et al., 2002).

A exposição ao déficit hídrico geralmente leva a um desbalanço entre a absorção e a utilização da energia luminosa nos cloroplastos. Tal desbalanço pode causar um expressivo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais estão associadas a diversos danos celulares, tais como a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, o que, em última instância, pode causar a morte do tecido vegetal. As plantas apresentam, no entanto, diversos mecanismos para remover esses radicais livres, os quais envolvem a ação de antioxidantes enzimáticos ((como as enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutathione (GR)) e não enzimáticos (e.g., alfa-tocoferol, ascorbato, glutathione) (Niyogi, 2000; Noctor et al., 2012; Suzuki et al., 2012).

Em adição aos compostos comumente apontados como moléculas do metabolismo antioxidante, estudos diversos têm demonstrado que os metabólitos secundários também são importantes moléculas na remoção das ROS (Castelluccio et al., 1995; Grace e Logan, 2000; Yildiz-Aktas et al., 2009; Maeda e Dudareva, 2012; Sánchez-Rodríguez et al., 2012). Tais compostos podem agir de forma direta, atuando como antioxidantes, ou de maneira indireta, drenando o excesso de poder redutor durante a sua biossíntese e, conseqüentemente, reduzindo a produção das ROS. Com efeito, Yildiz-Aktas et al. (2009) observaram, em plantas de algodão submetidas ao déficit hídrico, um incremento marcante nas concentrações de diversos compostos do metabolismo secundário, dentre eles os ácidos caféico e clorogênico. Registre-se que o ácido clorogênico é potencialmente mais redutor que o ácido ascórbico, um dos principais antioxidantes vegetais (Grace e Logan, 2000). Embora há muito se saiba que plantas do gênero *Coffea* acumulem grandes quantidades de compostos do metabolismo secundário (Barroset al., 1994; Ashihara et al., 2008), principalmente compostos fenólicos (Salgado et al., 2008), pouco se sabe a respeito da participação desses compostos nos mecanismos de defesa associados a estresses.

Nos últimos anos, é cada vez maior o número de estudos que demonstram a importância do metabolismo mitocondrial na manutenção de outros processos fisiológicos, principalmente em condições de estresses (Nunes-Nesi et al., 2011). De fato, além da síntese de ATP, a respiração também tem papel essencial em outros diversos processos que

estão relacionados com a manutenção da fotossíntese, tais como: i) fornecimento de boa parte do ATP necessário para a síntese de sacarose; ii) assimilação de nitrato; iii) produção de ácido ascórbico, antioxidante essencial em diversos processos relacionados à prevenção e combate de radicais livres; iv) consumo do excesso de poder redutor (NADPH) prevenindo, assim, a sobrerredução da cadeia de transporte de elétrons (Atkins, 2009; Nunes-Nesi et al., 2012). Assim, o processo respiratório pode atuar como uma válvula que regula o balanço redox celular que, em última instância, permite a otimização da fotossíntese. Nesse contexto, fica clara a importância da integração metabólica para a manutenção da homeostase celular, principalmente em condições de estresse.

Embora algumas teorias predigam que a exposição contínua a um determinado tipo de estresse resulte em uma redução do rendimento e perda da capacidade de resposta quando comparada com apenas um evento estressante (Scheffe et al., 2011), outros estudos demonstram que as plantas são capazes de se aclimatar e, até mesmo, exibir respostas mais rápidas e em maior magnitude quando submetidas a eventos recorrentes de estresses (Bruce et al., 2007; Lambers et al., 2008). Nesse sentido, plantas previamente submetidas a um determinado tipo de estresse podem desenvolver, *a posteriori*, algum tipo de “memória”, que, na literatura, é chamada de “memória do estresse”; essa memória facilitaria e potencializaria as respostas de defesa quando a planta é novamente submetida àquele mesmo agente estressor (Bruce et al., 2007; Iwasaki e Paszkowski, 2014). Evidências dessa teoria podem ser observadas em estudos com gramíneas, nos quais plantas submetidas a ciclos de déficit hídrico apresentaram respostas de proteção mais marcantes frente a eventos recorrentes de deficiência hídrica (Waltera et al., 2011). Mais recentemente, Dinget al. (2012) observaram que, a cada ciclo de déficit hídrico, plantas de *Arabidopsisthaliana* tiveram uma maior expressão de genes que conferem tolerância à seca em relação às plantas não estressadas. Essas respostas permitiram que plantas que já haviam vivenciado períodos de exposição à seca potencializassem as respostas de recuperação àquele fator estressante.

Apesar de várias evidências apontarem para um mecanismo de memória associada ao estresse, ainda não se sabe ao certo como essa memória seria formada e onde ela seria armazenada. Aparentemente, tais informações seriam retidas no próprio DNA do organismo. No entanto, em vez de promover alterações no código de bases do genoma, o

que poderia levar a mutações potencialmente letais, ocorreriam alterações conformacionais do material genético que, por sua vez, mudariam a forma como o material genético é empacotado e expresso. Essas alterações conformacionais estão diretamente relacionadas com a inserção e remoção de grupos químicos (metilações, acetilações, ubiquitinações e fosforilações) na estrutura da cromatina que, em conjunto, recebem o nome de alterações epigenéticas (Bird, 2007). Desta forma, as alterações nas histonas atuariam como “marcas” que deixariam certas regiões do genoma em “estado de alerta”. Esse estado de alerta levaria a uma expressão mais rápida e em maior magnitude de genes que conferem tolerância a um determinado tipo de estresse, como o déficit hídrico (Sokol et al., 2007; Kim et al., 2010). Isso posto, sugere-se que plantas previamente expostas a eventos de seca podem apresentar respostas de tolerância e de recuperação mais rápidas do que aquelas que estão experimentando o primeiro evento estressante (Kim et al., 2012). No entanto, é importante salientar que, até o momento, poucos são os trabalhos que envolvem ciclos de déficit hídrico e alterações epigenéticas. Além disso, a grande parte desses trabalhos tem focado apenas em alterações na expressão de poucos genes, deixando de lado as respostas fisiológicas e bioquímicas. Tais informações são de grande importância para uma melhor compreensão das estratégias envolvidas na recuperação de plantas submetidas a ciclos de déficit hídrico, bem como os possíveis mecanismos envolvidos com a geração da “memória ao estresse”. Nesse sentido, o conhecimento da capacidade e dos processos relacionados com a recuperação das plantas submetidas a esses ciclos de deficiência hídrica podem ter grande importância em programas de melhoramento e também na otimização de sistemas de irrigação (Galléet al., 2007).

O café é uma das mercadorias mais importante do comércio mundial de produtos agropecuários, sendo uma importante fonte de renda em diversos países, especialmente no Brasil, que é, há longa data, o maior produtor. Estima-se que o mercado cafeeiro gere anualmente 90 bilhões de dólares e que, direta ou indiretamente, envolva mais de 500 milhões de pessoas (DaMatta et al., 2007). Dentre cerca de 100 espécies do gênero *Coffea*, apenas duas são exploradas economicamente, *Coffea arabica* (café arábica) e *C. canephora* (café robusta) (Davis et al., 2006). No Brasil, a produção do café robusta é proveniente, principalmente, da variedade *kouillou* (grupo Guineano), mais comumente conhecida como conilon.

Alguns estudos têm demonstrado que, dentro de *C. canephora*, existe uma grande variabilidade genética no que respeita a diferentes estratégias de tolerância à seca. Ronchi e DaMatta (2007) compilaram várias informações disponíveis e sugerem três estratégias possivelmente envolvidas na tolerância diferencial de clones de café conilon à seca: (i) clones sensíveis à seca com controle deficiente da transpiração, com seus estômatos respondendo de forma limitada à redução da disponibilidade de água do solo ou à demanda evaporativa da atmosfera; (ii) clones tolerantes com sistema radicular relativamente profundo, alta sensibilidade estomática à disponibilidade de água e baixas taxas de uso da água, postergam a desidratação de seus tecidos, mantendo um balanço hídrico favorável e, assim, o vigor; (iii) clones tolerantes com sistema radicular relativamente profundo e sensibilidade estomática satisfatória à disponibilidade de água, mas com alta condutância hidráulica, têm comportamento intermediário no que concerne à desidratação dos seus tecidos sob déficit hídrico. Mais recentemente, em um estudo envolvendo 10 clones de *C. canephora*, Silva et al. (2013) observaram diferenças marcantes entre as estratégias morfo-fisiológicas utilizadas por esses clones durante a exposição à deficiência hídrica.

Apesar da quantidade de informações acumuladas sobre o comportamento de plantas de *C. canephora* submetidas à deficiência hídrica (Pinheiro et al., 2004, 2005; Praxedes et al., 2006; Silva et al., 2013), é importante salientar que todos os trabalhos realizados até o momento envolveram apenas um ciclo de seca. Diante do exposto, neste experimento, dois clones de *C. canephora*, com graus diferenciais de tolerância ao déficit hídrico, foram confrontados em um experimento fatorial, envolvendo ciclos de déficit hídrico. Características fisiológicas e bioquímicas foram avaliadas para testar as seguintes hipóteses: i) plantas submetidas a múltiplos ciclos de seca são capazes de apresentar respostas aclimatativas em maior magnitude do que plantas que foram submetidas a esse estresse apenas uma vez; ii) plantas tolerantes apresentam uma maior capacidade de acumular respostas diferenciais, ao longo dos ciclos de seca, do que plantas sensíveis, e iii) a integração entre os metabolismos primário e secundário desempenha papel primordial na manutenção da homeostase celular em condições de déficit hídrico.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Generalidades

Esse estudo foi conduzido em Viçosa (20°45'S, 42°51'W, 650 m altitude), Minas Gerais. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação em condições semicontroladas (radiação fotossinteticamente ativa de, aproximadamente, $1500 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com temperatura m\u00e9dia do ar de $30 \pm 2^\circ\text{C}$). Foram utilizados dois clones de *Coffeacanephora* Pierre 'conilon' com toler\u00e2ncia diferencial \u00e0 seca: clone 120 (tolerante) e clone 109A (sens\u00edvel) (Pinheiro et al., 2004, 2005; Silva et al., 2013).

Mudas com quatro pares de folhas, provenientes do enraizamento de estacas de ramos ortotr\u00f3picos, obtidas no Instituto Capixaba de Assist\u00eancia T\u00e9cnica e Extens\u00e3o Rural (Incaper), foram plantadas e cultivadas em vasos de polipropileno de 24 dm^3 , contendo substrato constitu\u00eddo de uma mistura de solo, esterco bovino e areia (4:1:1, v/v/v). A aduba\u00e7\u00e3o e a corre\u00e7\u00e3o do pH do substrato foram feitas de acordo com an\u00e1lise de solo e recomenda\u00e7\u00f5es t\u00e9cnicas usuais para a cultura. Ap\u00f3s o pegamento das mudas, aproximadamente aos 60 dias ap\u00f3s o transplante, e a intervalos de 30 dias, foram feitas aduba\u00e7\u00f5es nitrogenadas em cobertura, aplicando-se 50 g de N m^{-3} de substrato, na forma de sulfato de am\u00f4nio. As plantas foram irrigadas periodicamente, procurando-se manter a umidade do solo pr\u00f3xima \u00e0 capacidade de campo. Para evitar a perda de \u00e1gua por evapora\u00e7\u00e3o, coberturas pl\u00e1sticas foram colocadas em todos os vasos. Quinzenalmente, as plantas foram casualizadas sobre a bancada.

Em novembro de 2013, os clones foram submetidos a regimes h\u00eddricos diferenciais: um grupo de plantas, sete plantas de cada clone, foi irrigado continuamente, de forma que a umidade do solo permanecesse pr\u00f3xima \u00e0 capacidade de campo (plantas-controle). Um segundo grupo de plantas (sete plantas de cada clone) foi submetido a apenas um ciclo de d\u00e9ficit h\u00eddrico, enquanto um terceiro grupo (sete plantas de cada clone) foi submetido a tr\u00eas ciclos de estresse (Figura 1). Cada ciclo de d\u00e9ficit h\u00eddrico consistiu de duas fases, uma de desidrata\u00e7\u00e3o e outra, de reidrata\u00e7\u00e3o (Figura 2). A desidrata\u00e7\u00e3o foi feita mediante suspens\u00e3o da irriga\u00e7\u00e3o, at\u00e9 que a umidade atingisse 25% da \u00e1gua dispon\u00edvel no solo, em rela\u00e7\u00e3o \u00e0 capacidade de campo. As plantas permaneceram nessa condi\u00e7\u00e3o de seca por 14 dias, quando, ent\u00e3o, foram avaliados par\u00e2metros fisiol\u00f3gicos e coletadas amostras para an\u00e1lises

bioquímicas (análises descritas nas seções abaixo). Após as avaliações, as plantas foram reidratadas via elevação da umidade do solo à capacidade de campo (recuperação). O tempo de recuperação, de aproximadamente dez dias, foi acompanhado por meio de parâmetros fisiológicos (potencial hídrico na antemanhã (Ψ_{am}) e taxa de assimilação líquida de carbono (A) e g_s). Para garantir que as plantas submetidas à seca estivessem realmente recuperadas, um novo ciclo de déficit hídrico somente foi imposto (terceiro grupo de plantas) quando as plantas que foram submetidas à desidratação exibiram características fisiológicas (Ψ_{am} , A e g_s) cujos valores fossem essencialmente similares aos de suas respectivas plantas-controle.

Em nível foliar, todas as avaliações e amostragens foram realizadas nas folhas mais novas, totalmente expandidas, do terceiro ou quarto par, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos. As metodologias utilizadas ao longo do experimento estão descritas abaixo.

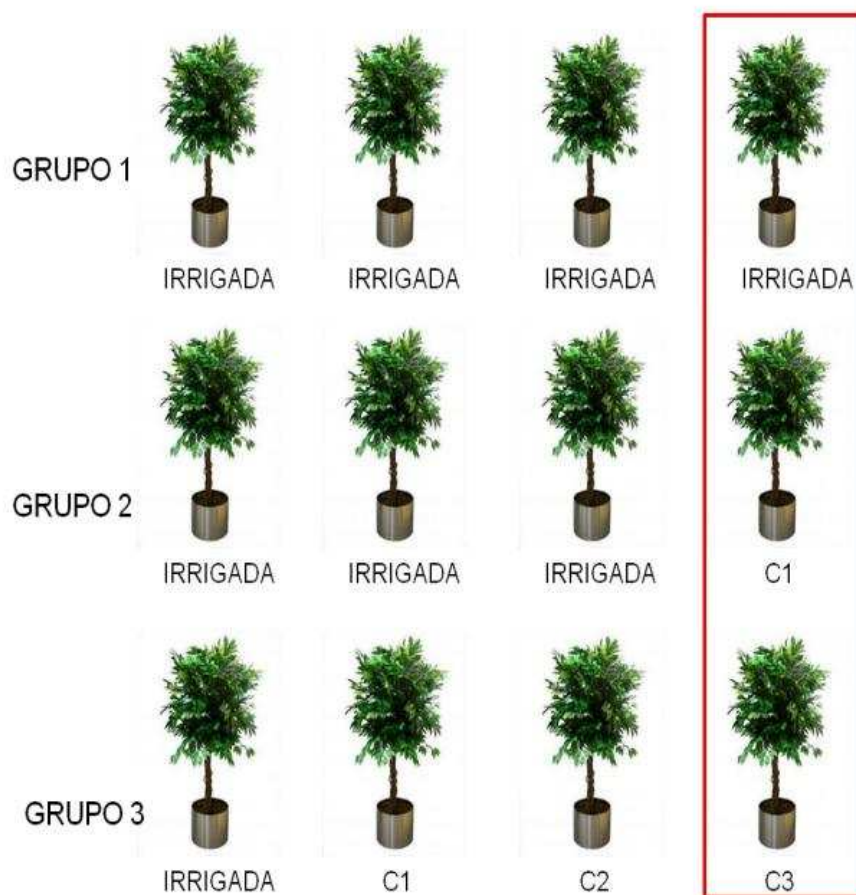


Figura 1. Representação esquemática dos tratamentos: grupo 1, plantas mantidas na

capacidade de campo durante todo o período experimental (CT); grupo 2, plantas submetidas a apenas um ciclo de déficit hídrico (C1); e, grupo 3, plantas submetidas a três ciclos de desidratação (C3). Os retângulos em vermelho representam os momentos em que os tratamentos foram avaliados e comparados.

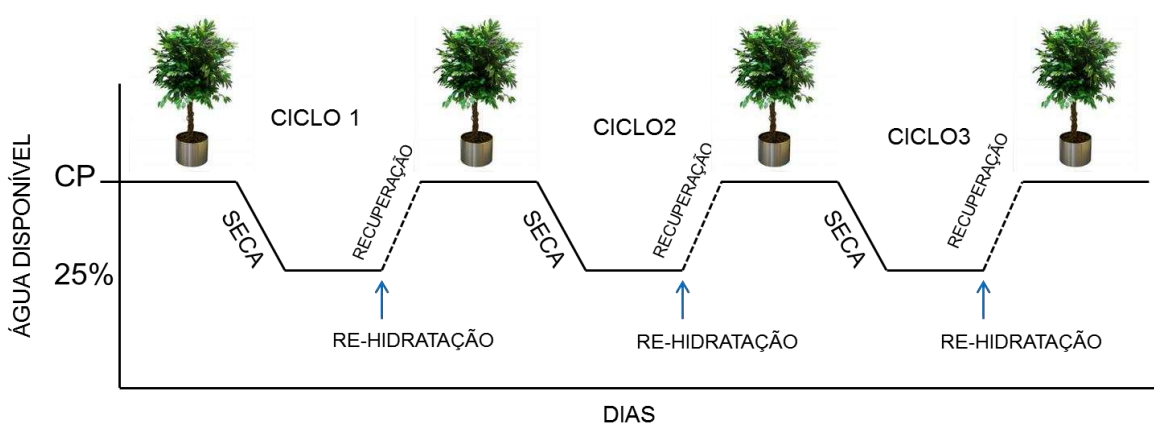


Figura 2. Modelo esquemático dos ciclos de desidratação e rehidratação em clones de *Coffea canephora* (grupo 3).

2.2. Relações hídricas

Potencial hídrico: O potencial hídrico foliar foi determinado em folhas individuais com uma bomba de pressão tipo Scholander, na antemãhã (04:30 h – 05:30h) (Ψ_{am}) e ao meio-dia (Ψ_{md}).

Condutividade hidráulica foliar: A condutividade hidráulica foliar (K_F) foi medida usando a técnica da cinética de reidratação originalmente descrita por Brodribb e Holbrook (2003). A técnica é baseada na pressuposição de que a reidratação de folhas dessecadas é equivalente à carga de um capacitor através de um resistor. Assim, a seguinte formula foi usada para o cálculo:

$$K_{leaf} = C_F \ln(\Psi_0 \Psi_f^{-1}) t^{-1}$$

em que C_F ($\delta TRA / \delta \Psi_w$, MPa^{-1}) é a capacitância foliar, Ψ_0 é o potencial hídrico foliar pré-reidratação, Ψ_f é o potencial hídrico pós-reidratação e t é o tempo de reidratação. O cálculo de K_{leaf} ($mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1}$) requer que C_F , determinado por meio de curvas pressão-

volume, pela inclinação da relação entre o teor relativo de água (TRA) e Ψ_w , seja expresso em termos absolutos e normalizado pela área foliar. Portanto,

$$C_f = \delta \text{TRA} / \delta \Psi_w (\text{MS/AF}) (\text{WW/MS}) / M$$

em que MS é a massa seca da folha (g), AF é a área foliar (m^2), WW é a massa de água na folha saturada (100% TRA, g) e M é a massa molar da água (g mol^{-1}).

Para a reidratação das folhas ramos plagiotrópicos com pelo menos quatro pares de folhas foram coletados na manhã e transportados para o laboratório, onde foram cortados novamente sob água para que se reidratassem por um período de 1 a 4 h. Após esse período, esses ramos foram retirados da água e sofreram processo de secagem em bancada, até que atingissem um potencial hídrico de aproximadamente -1 MPa, quando foram colocados em um saco plástico no escuro, por 1 h, para minimizar a variação de potencial hídrico entre folhas. Duas folhas foram então destacadas do ramo para a determinação de Ψ_0 ; caso este diferisse por mais de 0,1 MPa entre as folhas, o ramo foi descartado. As folhas foram reidratadas pela submersão dos ramos em água desionizada, de modo que o pecíolo da folha-alvo pudesse ser cortado sob água. O tempo de reidratação foi de aproximadamente 20 s e, logo em seguida, o pecíolo foi seco em papel toalha e imediatamente foi medido o Ψ_f . Posteriormente, a folha usada no processo de reidratação teve sua área medida via scanner de mesa e a massa foi determinada após secagem em estufa de ventilação forçada, por um período de 72 h, a 70°C.

Curvas pressão-volume: Folhas de cada tratamento foram coletadas na antemã e levadas ao laboratório e analisadas segundo a metodologia proposta por DaMatta et al. (1993) e Pinheiro et al. (2005). Durante o processo de desidratação das folhas (transpiração livre), o peso fresco e Ψ_w correspondente foram tomados a curtos intervalos de tempo, até que o Ψ_w atingisse aproximadamente -3,0 MPa. A partir das curvas pressão-volume, foram estimados: o potencial osmótico global médio em turgescência plena ($\Psi\pi_{100}$), o potencial osmótico global médio em turgescência nula incipiente ($\Psi\pi_0$) e o módulo global de elasticidade (ϵ).

2.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

A taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (g_s), a concentração interna de CO_2 (C_i) e a taxa transpiratória (E) foram determinadas em sistema aberto, sob luz saturante ($1000 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e pressão parcial de CO_2 de 40 Pa, com um analisador de gases a infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6400-02B, LI-COR).

Na antemanhã, foi obtida a fluorescência mínima (F_0) via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade ($0,03 \mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluorescência máxima (F_m) foi obtida pela aplicação de um pulso de 0,8 s de luz actínica saturante ($8000 \mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluorescência variável (F_v) foi determinada pela diferença entre F_0 e F_m e, a partir desses valores, foi calculado o rendimento quântico potencial do fotossistema II (van Kooten e Snel, 1990), conforme a equação:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

As folhas foram aclimatadas à luz actínica ($1000 \mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 60 s, a fim de se obter a fluorescência transiente (F_s), seguido por um pulso de luz saturante para estimar-se a fluorescência máxima à luz (F_m') e, por último, aplicou-se um pulso de luz vermelho-distante, para obter-se a fluorescência mínima após aclimação à luz actínica (F_0'). Com esses parâmetros, foram calculados os coeficientes de extinção fotoquímica (q_p), a eficiência fotoquímica do transporte de elétrons associado ao fotossistema II (ϕ_{FSII}) e a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos (F_v'/F_m'), conforme Maxwell e Johnson (2000). A taxa aparente de transporte de elétrons (J) foi calculada seguindo procedimentos descritos por Genty et al. (1989), como sendo $J = \phi_{\text{FSII}} \times \beta \times \alpha \times \text{RFA}$, em que RFA é a radiação fotossinteticamente ativa, α é a absorvância da folha (0,84) e β reflete o particionamento dos pacotes de energia entre os fotossistemas II e I (0,5).

A respiração mitocondrial durante o dia (R_L) foi estimada de acordo com Bai et al. (2008), usando a respiração noturna ou a taxa de assimilação líquida de CO_2 antes do amanhecer (R_n). R_L foi estimada a diferentes temperaturas usando o Q_{10} (Larcher 1983), como a seguir:

$$R_L = R_n Q_{10}^{(T_d - T_n)/10} \quad (Q_{10} = 2,2);$$

em que T_n é a temperatura foliar no qual a R_n foi medida, e T_d é a temperatura foliar na qual a R_L foi calculada.

O fluxo de elétrons usado para carboxilação (J_c) e oxigenação (J_o) da RuBP, bem como a taxa de fotorrespiração da Rubisco (P_R) foram obtidas usando-se as seguintes fórmulas (Epron et al., 1995; Valentini et al., 1995):

$$J_c = 1/3 [J_T + 8 (A + R_L)];$$

$$J_o = 2/3[J_T + 4 (A + R_L)];$$

$$P_R = 1/12 [J_T - 4 (A + R_L)];$$

2.4. Ensaios bioquímicos e enzimáticos

2.4.1 Determinação da concentração de carboidratos e aminoácidos

Amostras foliares liofilizadas foram submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de glicose, frutose e sacarose (Fernie et al., 2001) e aminoácidos totais (Gibon et al., 2004). Na fração insolúvel, determinaram-se os teores de amido e proteína total (Fernie et al., 2001; Gibon et al., 2004).

2.4.2. Determinação dos níveis de nucleotídeos

Amostras liofilizadas de folhas foram extraídas a frio em $HClO_4$ 0,1 M, para determinação de $NAD^+/NADP^+$ e, em KOH 0,1M, para determinação de NADH/NADPH, segundo Queval e Noctor (2007). Em seguida, os extratos ácidos e alcalinos foram incubados em meios de reação apropriados para a quantificação subsequente dos nucleotídeos (Gibon e Larher, 1997; Schippers et al., 2008).

2.4.3. Perfil metabólico

As amostras vegetais foram liofilizadas a $-48^\circ C$ e maceradas em moinho de bolas. Metabólitos do metabolismo primário e, alguns dos secundário, foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) com base em perfis metabólicos, exatamente como descrito por Lisec et al, (2006). O cromatograma e o

espectro de massa foram avaliados usando o programa TAGFINDER (Luedemann et al., 2008). Os metabólitos foram identificados em comparação com banco de dados criados a partir de padrões autênticos (Kopka et al., 2005; Schauer et al., 2005). A identificação e a anotação dos picos detectados seguiram as recomendações descritas em Fernie et al. (2011).

2.4.4. Enzimas do metabolismo do carbono

Para as análises das seguintes enzimas, os extratos vegetais foram preparados exatamente conforme descrito por Nunes-Nesi et al. (2007). Foram quantificadas a malato desidrogenase dependente de NAD^+ , sacarose sintase, Rubisco (Sulpice et al., 2007); triose fosfato isomerase, gliceraldeído3-fosfato desidrogenase dependente de NADPH (Fernie et al., 2001); aldolase, fosfofrutocinase e piruvato cinase (Gibon et al., 2004).

2.4.5. Enzimas do metabolismo antioxidativo

Amostras foliares foram homogeneizadas em um meio de extração contendo tampão fosfato de potássio (0,1 M), EDTA (0,1 mM), DTT (2 mM), ácido ascórbico (20 mM) e PVPP (4%). O extrato resultante foi utilizado para determinar a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutatona (GR), conforme descrito por Lima et al. (2002) e Pinheiro et al. (2004).

2.4.6. Danos celulares

A estimativa de danos celulares foi feita mediante a quantificação de aldeído malônico (MDA), segundo Hodges et al. (1999). Para tal, discos foliares foram macerados em uma solução de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA). O extrato resultante foi adicionado a uma solução contendo TCA a 20% e ácido tiobarbitúrico (0,5%). Para minimizar a interferência de açúcares e compostos fenólicos, a absorvância foi lida em diferentes comprimentos de onda (440, 532 e 600 nm).

2.7. Análise estatística

O experimento foi instalado e analisado segundo o delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (dois clones x dois regimes hídricos x dois ciclos distintos de desidratação e reidratação), com sete repetições. Os dados obtidos

foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Com o objetivo de reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados e identificar as variáveis que explicam a maior proporção da variância total, de modo a descreverem-se as estratégias que estariam conferindo uma tolerância diferencial à seca dos clones estudados, foi empregada a técnica de análise multivariada em componentes principais.

Foram também feitas análises de correlações simples de Pearson entre todas as variáveis analisadas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 1993).

3 - RESULTADOS

3.1. Relações hídricas

Independentemente do clone avaliado, em condições de ampla irrigação, o potencial hídrico na antemanhã (Ψ_{am}) sempre foi maior do que -0.1 MPa, demonstrando que as plantas mantiveram-se hidratadas durante todo o período experimental (Figura 3). A redução na disponibilidade hídrica causou reduções marcantes de Ψ_{am} ao fim do primeiro (C1) e terceiro (C3) ciclos de seca nos dois clones; no entanto, tais reduções foram mais expressivas para o clone 109 (Figura 3). É importante ressaltar que as plantas do clone 120 expostas a múltiplos ciclos de seca tiveram valores mais negativos de Ψ_{am} (-0,41 MPa) do que as plantas expostas a apenas um ciclo (-0,32 MPa). A mesma tendência de resposta também foi observada para o clone 109, no entanto, sem diferenças estatísticas (Figura 3).

Em condições irrigadas, o potencial hídrico ao meio-dia (Ψ_{md}) não variou entre os clones (-0.60 MPa), observando-se o mesmo padrão nas plantas submetidas à seca, porém, com valores mais negativos ($\sim -2,24$ MPa) (Figura 3). De modo semelhante, independentemente do tratamento, não foram observadas alterações no potencial osmótico global médio em turgescência plena ($\Psi\pi_{100}$) e nula incipiente ($\Psi\pi_0$) e, também, no módulo global de elasticidade (ϵ). É importante ressaltar que, ao contrário do observado para o Ψ_{am} , os ciclos de seca não acarretaram efeitos significativos nos valores de Ψ_{md} , $\Psi\pi_{100}$, $\Psi\pi_0$ e ϵ .

Os valores de condutividade hidráulica foliar (K_F) não variaram entre os clones ($\sim 13,2 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}$) nas plantas irrigadas (Figura 3). Por outro lado, a seca acarretou respostas muito diferentes entre as plantas dos dois clones. Embora em ambos tenha havido reduções significativas de K_F , tais reduções foram mais expressivas no clone 109 (79.2%) do que no clone 120 (29.2%) (Figura 3). Saliente-se que os ciclos de seca não afetaram significativamente os valores de K_F .

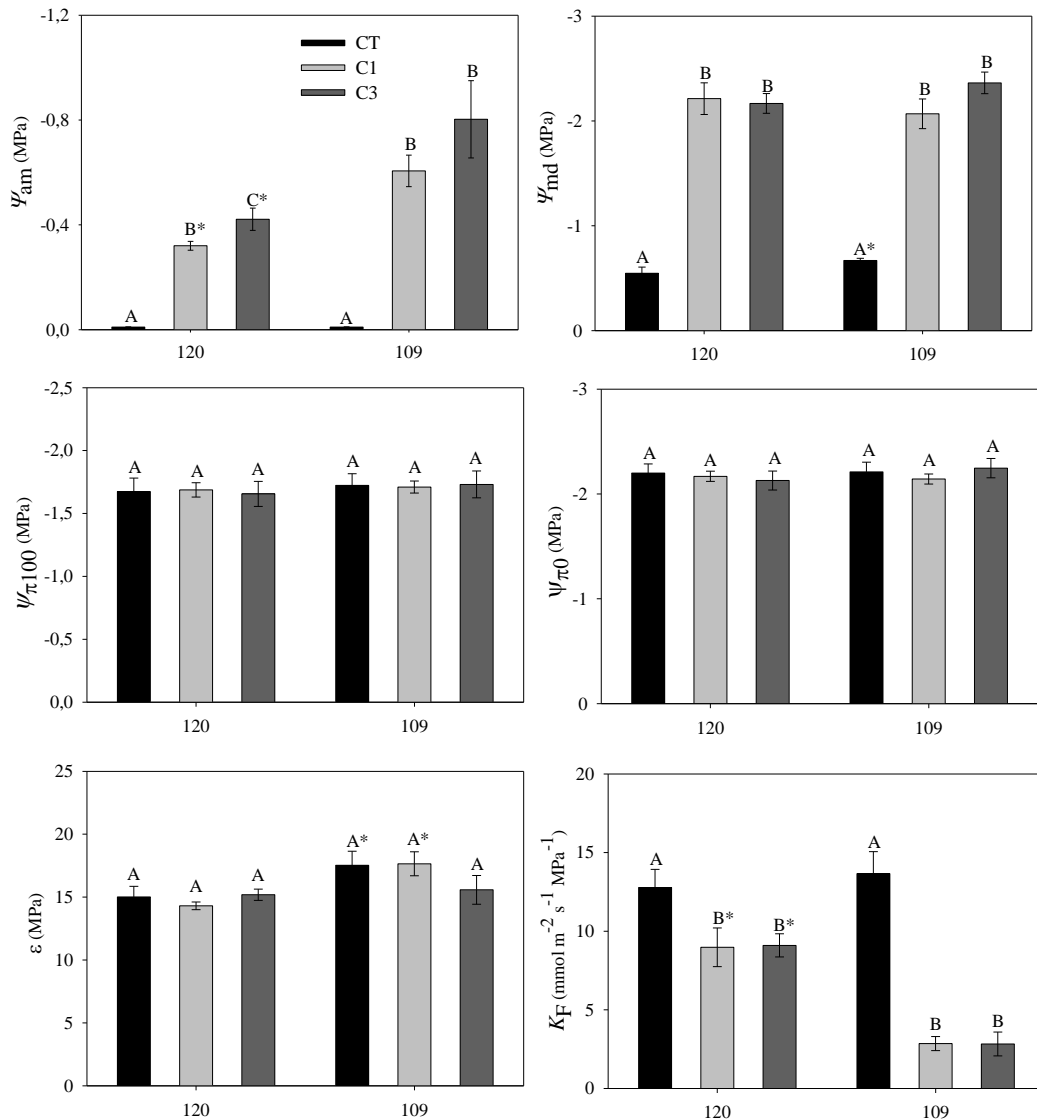


Figura 3. Potencial hídrico na antemã (Ψ_{am}), potencial hídrico ao meio-dia (Ψ_{md}), potencial osmótico global médio em turgescência plena ($\Psi_{\pi 100}$), potencial osmótico global médio em turgescência nula incipiente ($\Psi_{\pi 0}$), módulo global de elasticidade (ϵ) e condutividade hidráulica foliar (K_F) em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT; barras negras) e expostos a um ciclo (C1; barras cinza-claro) e a três ciclos de seca (C3; barras cinza-escuro). Valores são médias \pm erro-padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro de um mesmo clone ($P \leq 0,05$; teste de Duncan), e asteriscos indicam diferenças entre os clones, dentro de um mesmo regime hídrico ($P \leq 0,05$; teste *t*).

3.2. Trocas gasosas

Nas plantas-controle dos clones avaliados, os valores da taxa de assimilação líquida de carbono (A) ($\sim 10,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s) ($\sim 0,181 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa transpiratória (E) ($\sim 2,9 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 (C_i) ($\sim 282 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e taxa de respiração noturna (R_n) ($\sim 1,83 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram essencialmente similares (Figura 4). A seca, por sua vez, causou alterações marcantes nos padrões de trocas gasosas em ambos os clones, particularmente no clone 109, que teve redução média entre os tratamentos de 87% em g_s , 80% em E e 18% em C_i , enquanto no clone 120 estas reduções foram de 69% em g_s , 41% em E e 30% em C_i , em relação às respectivas plantas-controle (Figura 4). O déficit hídrico também promoveu reduções significativas nos valores de R_n nos tratamentos C1 e C3 do clone 109 ($\sim 34\%$) e no tratamento C1 do clone 120 (31%) (Figura 4).

Ressalte-se que as plantas do tratamento C3 do clone 120 apresentaram maiores taxas fotossintéticas do que as do tratamento C1, tendência que também foi observada nas plantas do clone 109, porém, sem diferenças estatísticas (Figura 4). O melhor desempenho fotossintético das plantas expostas a múltiplos ciclos de seca pode ser mais bem observado quando os valores de A entre os tratamentos são expressos em relação aos das plantas-controle. No clone 120, as reduções de A foram de 54% no tratamento C1 e de 33% no tratamento C3, enquanto no clone 109 as reduções foram de 84% (tratamento C1) e 71% (tratamento C3), em relação às respectivas plantas-controle (Figura 4).

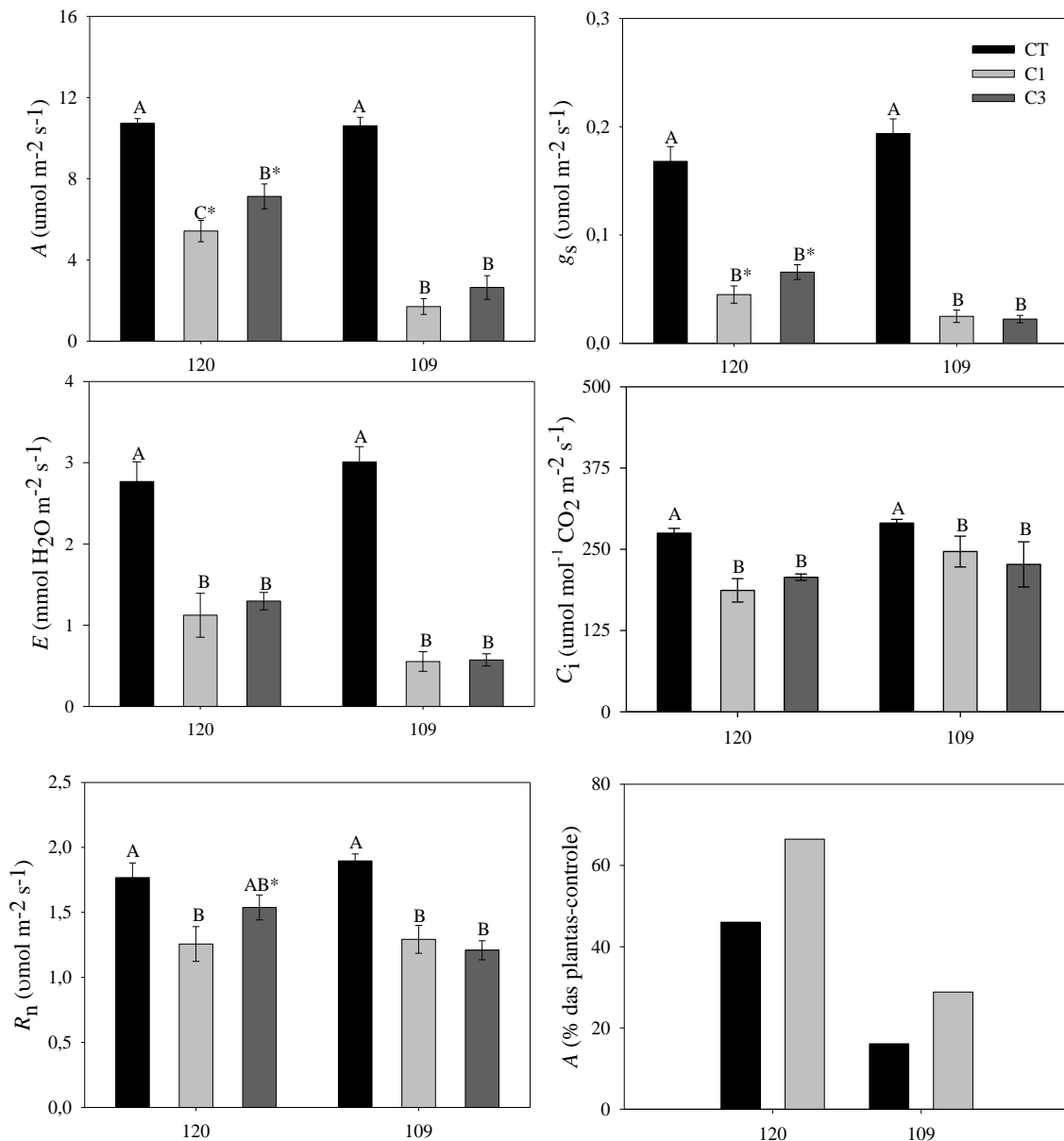


Figura 4. Taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E), concentração interna de CO_2 (C_i), respiração noturna (R_n) e porcentagem de A relação às plantas controle em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT; barras negras) e expostos a um ciclo (C1; barras cinza-claro) ou a três ciclos de seca (C3; barras cinza-escuro). Valores são médias \pm erro-padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro de um mesmo clone ($P \leq 0,05$; teste de Duncan), e asteriscos indicam diferenças entre os clones, dentro de um mesmo regime hídrico ($P \leq 0,05$; teste t).

3.3. Fluorescência da clorofila *a* e fotorrespiração

Em condições irrigadas, as plantas avaliadas não diferiram em nenhum dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (Tabela 1). Por outro lado, na seca, foi possível observar comportamento distinto entre os clones. A taxa aparente de transporte de elétrons total (J_t) reduziu-se significativamente em ambos os tratamentos do clone 109 (~28%), enquanto no clone 120 tais reduções foram observadas apenas no tratamento C1 (19%). Este mesmo padrão de resposta também foi encontrado para a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos (F_v/F_m). Por outro lado, reduções no coeficiente de dissipação fotoquímico (q_p) foram observadas apenas nas plantas do tratamento C1 do clone 109 (30%) (Tabela 1).

Nas plantas-controle, independentemente dos clones avaliados, não foram observadas diferenças significativas quanto à partição de elétrons entre as vias carboxilativas (J_c) e oxigenativas (J_o) (Tabela 1). Por outro lado, a exposição à seca promoveu alterações marcantes em J_c , enquanto os valores de J_o permaneceram praticamente inalterados, culminando, assim, em aumentos na razão J_o/J_c . Embora o aumento nessa razão não tenha variado entre os ciclos de seca, tais alterações foram mais expressivas nas plantas do clone 109 do que nas do clone 120 (Tabela 1). De forma semelhante, as altas reduções em A induzidas pela seca, acompanhadas de pequenas alterações em R_p , também levaram a um aumento expressivo na razão R_p/A_b , principalmente no clone 109, no entanto, sem diferenças significativas entre os ciclos de seca. Ressalta-se que a exposição ao déficit hídrico não promoveu reduções no rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) em nenhum dos tratamentos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1. Fluorescência e fotorrespiração. Rendimento quântico efetivo do PSII (F_v/F_m), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos (F_v'/F_m'), coeficiente de dissipação fotoquímico (q_p), taxa de transporte de elétrons (J_t), razão de elétrons direcionados a oxigenação/carboxilação (J_o/J_c), razão entre a taxa fotorrespiratória (R_p) e a fotossintética bruta (fotossíntese mais respiração e fotorrespiração) (A_b) em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT) e expostos a um ciclo (C1) ou a três ciclos de seca (C3). Valores são médias \pm erro-padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro de um mesmo clone ($P \leq 0,05$; teste de Duncan), e asteriscos indicam diferenças entre os clones, dentro de um mesmo regime hídrico ($P \leq 0,05$; teste *t*).

Parâmetro	Clone 120			Clone 109		
	CT	C1	C3	CT	C1	C3
F_v/F_m	0.79 (0,01) A	0.79 (0,01) A	0.8 (0,01) A	0.79 (0,01) A	0.81 (0,01) A	0.79 (0,01) A
F_v'/F_m'	0.57 (0,01) A	0.52 (0,01) B	0.56 (0,01) AB	0.56 (0,01) A	0.51 (0,02) B	0.50 (0,03) B
q_p	0.37 (0,02) A	0.32 (0,03) A	0.34 (0,02) A	0.36 (0,02) A	0.26 (0,04) B	0.32 (0,02) AB
J_t	105.9 (5,25) A	85.2 (7,88) B*	97.1 (5,82) AB*	101.2 (5,29) A	65.8 (8,83) B	80.2 (6,29)
J_o/J_c	0.32 (0,02) B	0.46 (0,02) A	0.42 (0,02) A	0.31 (0,02) B	0.59 (0,04) A*	0.58 (0,04) A*
R_p/A_b	0,30 (0,02) B	0.46 (0,03) A	0.41 (0,02) A	0.28 (0,02) B	0,64 (0,06) A*	0,63 (0,07) A*

3.4. Carboidratos e aminoácidos

Em condições de ampla disponibilidade hídrica, o clone 120 apresentou maiores níveis de frutose ($4.5 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ MS}$) enquanto o clone 109 teve maiores concentrações de amido ($28 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$); para os demais carboidratos (glicose, sacarose e açúcares solúveis totais) e, também, aminoácidos totais, não foram observadas diferenças significativas entre os clones (Figura 5). Contudo, quando expostos à seca, os clones tiveram uma marcante alteração na concentração de carboidratos e aminoácidos. Um padrão comum de resposta dos dois clones, em ambos os tratamentos, foi o de redução nas concentrações foliares de amido e sacarose, acompanhada pelo aumento nas concentrações de aminoácidos. Por outro lado, decréscimos nas concentrações de frutose (tratamentos C1 e C3) e de glicose (tratamento C3) só foram observadas nas plantas do clone 120 (Figura 5).

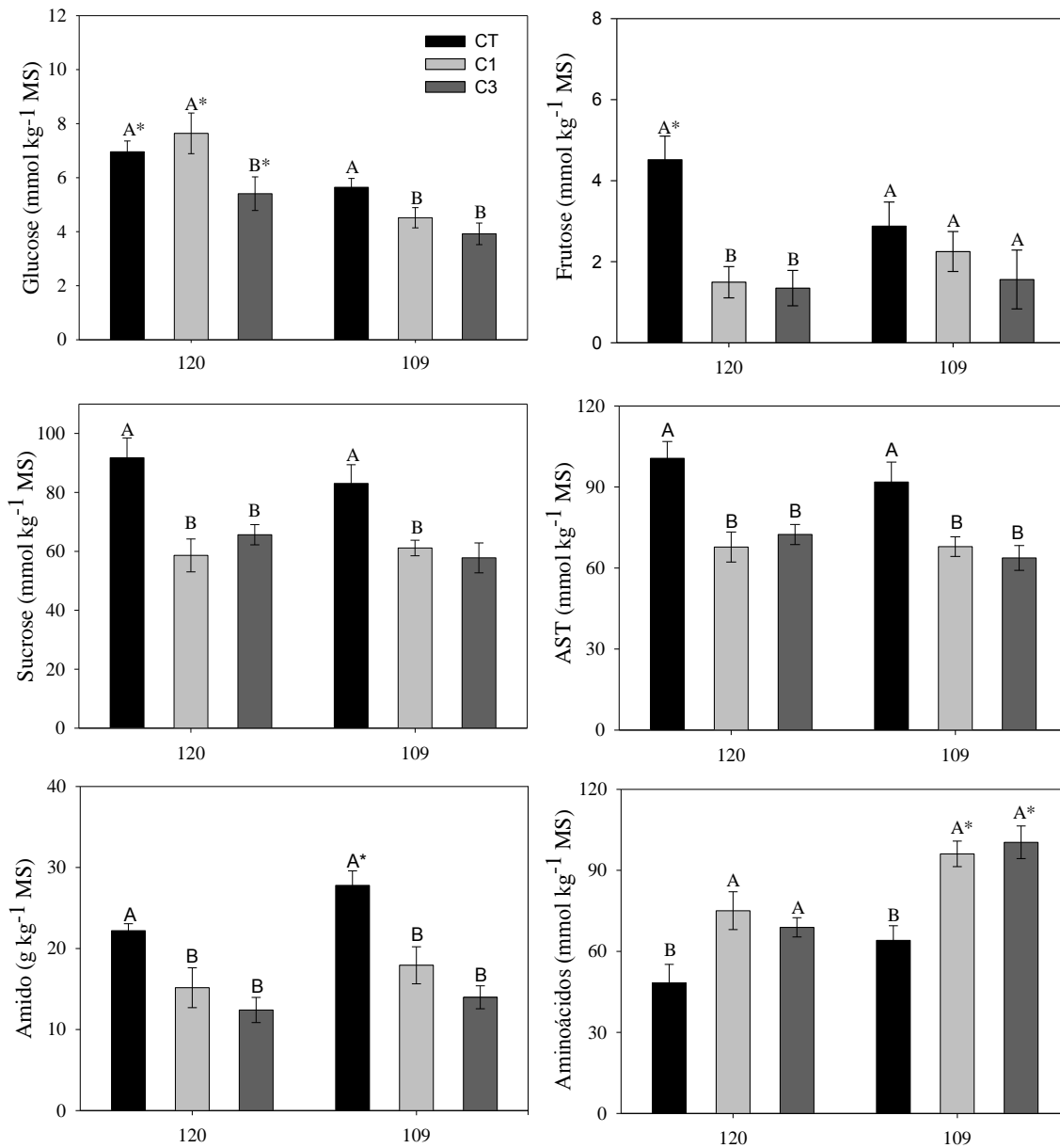


Figura 5. Concentrações foliares de glicose, frutose, sacarose, açúcares solúveis totais (AST), amido e aminoácidos solúveis totais em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT; barras negras) e expostos a um ciclo (C1; barras cinza-claro) ou a três ciclos de seca (C3; barras cinza-escuro). Valores são médias \pm erro-padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro de um mesmo clone ($P \leq 0,05$; teste de Duncan), e asteriscos indicam diferenças entre os clones, dentro de um mesmo regime hídrico ($P \leq 0,05$; teste *t*).

3.5. Enzimas do metabolismo do carbono

Independentemente dos clones estudados, houve grande similaridade nas atividades de praticamente todas as enzimas do metabolismo do carbono avaliadas. As únicas exceções foram as enzimas glicose-6P-desidrogenase e fosfofrutocinase, que tiveram maior atividade no clone 120 (Tabela 2). Quando submetidos ao déficit hídrico, um comportamento comum aos dois clones foi o aumento na atividade das enzimas fosfofrutocinase e aldolase (Tabela 2). Contudo, para as demais enzimas, o padrão de resposta variou com o clone avaliado. No clone 120, houve aumento na atividade da piruvato cinase, triose-fosfato isomerase e isocitrato desidrogenase, enquanto no clone 109 foi observado aumento de atividade da glicose-3P-desidrogenase, em relação às plantas-controle (Tabela 2). É importante ressaltar que algumas dessas respostas foram diferencialmente expressas nas plantas dos tratamentos C3 de ambos os clones, caso da fosfofrutocinase e da aldolase. De modo semelhante, as atividades inicial e final da Rubisco tiveram aumentos significativos, em relação às plantas-controle, apenas nas plantas C3, de ambos os clones; contudo, em nenhum tratamento houve variação no estado de ativação dessa enzima (Figura 6). Registre-se que, algumas respostas diferenciais foram intrínsecas a cada clone, caso do aumento na atividade das enzimas piruvato cinase, isocitrato desidrogenase e enolase no clone 120, e o aumento na atividade da glicose-3P-desidrogenase no clone 109 (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade de enzimas do metabolismo do carbono ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$) em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT) e expostos a um ciclo (C1) ou a três ciclos de seca (C3). Valores são médias \pm erro-padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro de um mesmo clone ($P \leq 0,05$; teste de Duncan), e asteriscos indicam diferenças entre os clones, dentro de um mesmo regime hídrico ($P \leq 0,05$; teste *t*).

Enzima	Clone 120			Clone 109		
	CT	C1	C3	CT	C1	C3
Sacarose sintase	1,30 (0,09) A	1,29 (0,11) A*	1,21 (0,15) A	1,13 (0,09) A	1,05 (0,09) A	1,17 (0,10) A
Fosfofrutocinase	0,48 (0,02) B*	0,47 (0,04) B	0,58 (0,03) A	0,41 (0,02) B	0,45 (0,04) AB	0,56 (0,05) A
Triose fosfato isomerase	27,5 (2,2) B	35,5 (2,1) A	33,4 (2,0) AB	31,3 (3,0) A	37,1 (2,7) A	34,7 (2,6) A
Gliceraldeído-3-P desidrogenase	3,44 (0,31) A	4,89 (0,26) A	4,62 (0,32) A	4,05 (0,52) B	5,11 (0,43) AB	5,48 (0,57) A*
Enolase	2,09 (0,2) A	1,78 (0,2) B*	2,17 (0,1) A*	2,08 (0,1) A	1,66 (0,1) B	1,79 (0,1) B
Piruvato cinase	4,12 (0,4) B	4,00 (0,4) B	5,07 (0,3) A*	3,92 (0,5) A	3,77 (0,4) A	3,91 (0,4) A
Isocitrato desidrogenase	0,82 (0,05) AB	0,76 (0,05) B*	0,88 (0,05) A*	0,70 (0,04) A	0,69 (0,08) A	0,76 (0,05) A
Malato desidrogenase (NAD ⁺)	54,8 (3,0) B	56,9 (4,9) B	68,9 (4,2) A	49,7 (4,4) B	60,0 (2,5) AB	66,6 (6,1) A
Aldolase	5,37 (0,28) B	6,48 (0,37) B	6,82 (0,37) A	5,11 (0,40) B	5,85 (0,33) B	7,46 (0,43) A

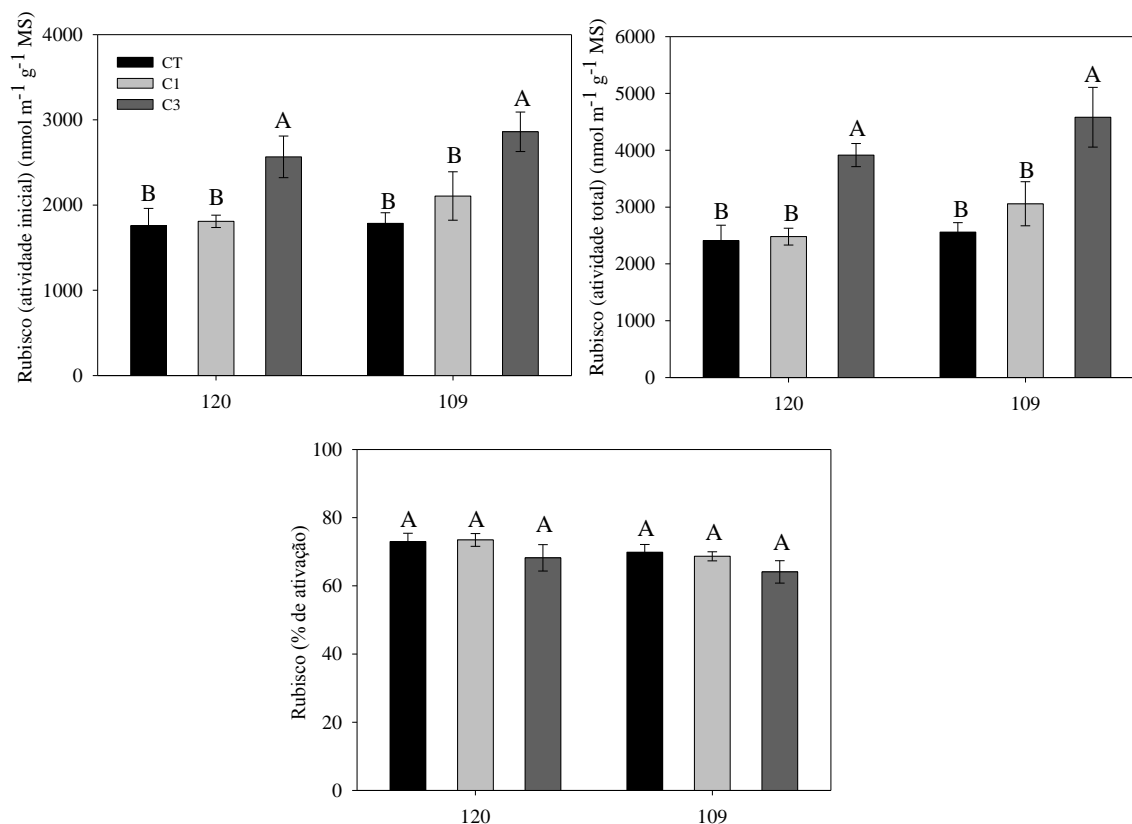


Figura 6. Atividade inicial, total e porcentagem de ativação da enzima Rubisco em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT; barras negras) e expostos a um ciclo (C1; barras cinza-claro) ou a três ciclos de seca (C3; barras cinza-escuro). Valores são médias \pm erro-padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro de um mesmo clone ($P \leq 0,05$; teste de Duncan), e asteriscos indicam diferenças entre os clones, dentro de um mesmo regime hídrico ($P \leq 0,05$; teste *t*).

3.6. Sistema antioxidativo, danos celulares e estado redox

Nas plantas-controle, a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT) foi maior no clone 109, enquanto a redutase da glutatona não variou entre os clones (Figura 7). O déficit hídrico promoveu aumento na atividade de todas as enzimas avaliadas, no entanto, diferenças entre os clones só foram observadas para as enzimas SOD e APX, que foram maiores no clone 109 (Figura 7). Além disso, a exposição a múltiplos eventos de seca potencializou a atividade das enzimas CAT e GR, uma vez que, ao longo dos ciclos, houve aumento significativo na atividade dessas enzimas, em relação às das plantas dos demais tratamentos (Figura 7). Ressalta-se que, independentemente do clone ou regime hídrico, não se observaram diferenças significativas nas concentrações de malonaldeído (MDA) (Figura 5).

Em condições de ampla disponibilidade hídrica, tanto os níveis de NAD^+ e NADP^+ , quanto as razões NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ foram maiores no clone 120, em relação ao observado no clone 109 (Figura 8). A exposição à seca promoveu alterações mínimas nos níveis de NAD^+ e NADH e, conseqüentemente, não foram observadas variações na razão NAD^+/NADH em nenhum dos tratamentos de ambos os clones, padrão de resposta que também foi observado para a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ para o clone 120 (Figura 8). Por outro lado, no clone 109, em ambos os ciclos de seca, foram observados aumentos significativos nos níveis de NADP^+ , sem quaisquer alterações nos níveis de NADPH , resultando, assim, em aumentos expressivos da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, em relação aos das respectivas plantas-controle (Figura 8). Ressalte-se que não foram observadas variações nas concentrações foliares dos nucleotídeos entre os ciclos de seca.

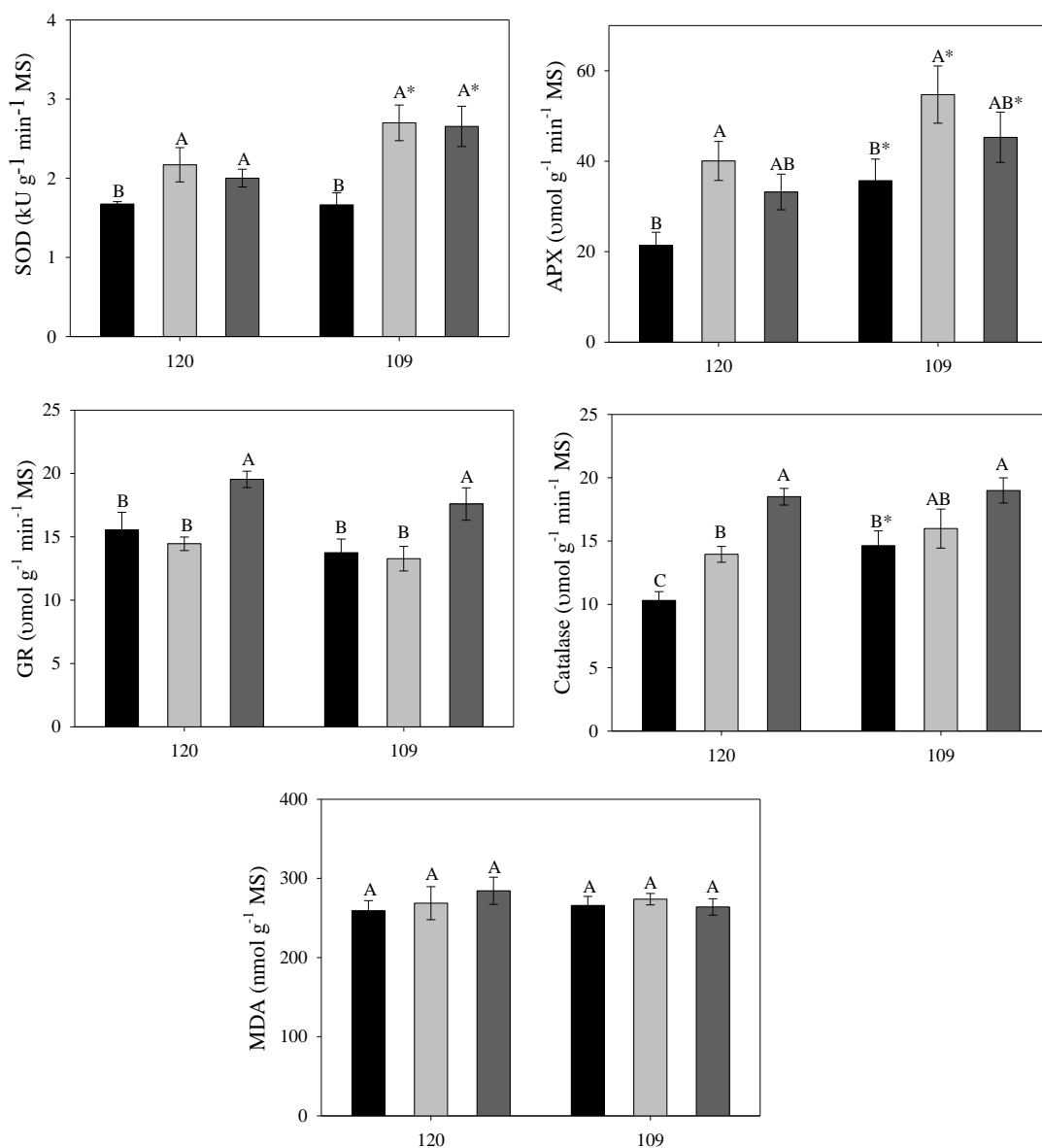


Figura 7. Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), Redutase da glutatona (GR), catalase (CAT) e estimativa de danos celulares pelos níveis de aldeído malônico (MDA) em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT; barras negras) e expostos a um ciclo (C1; barras cinza-claro) ou a três ciclos de seca (C3; barras cinza-escuro). Valores são médias ± erro-padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro de um mesmo clone ($P \leq 0,05$; teste de Duncan), e asteriscos indicam diferenças entre os clones, dentro de um mesmo regime hídrico ($P \leq 0,05$; teste *t*).

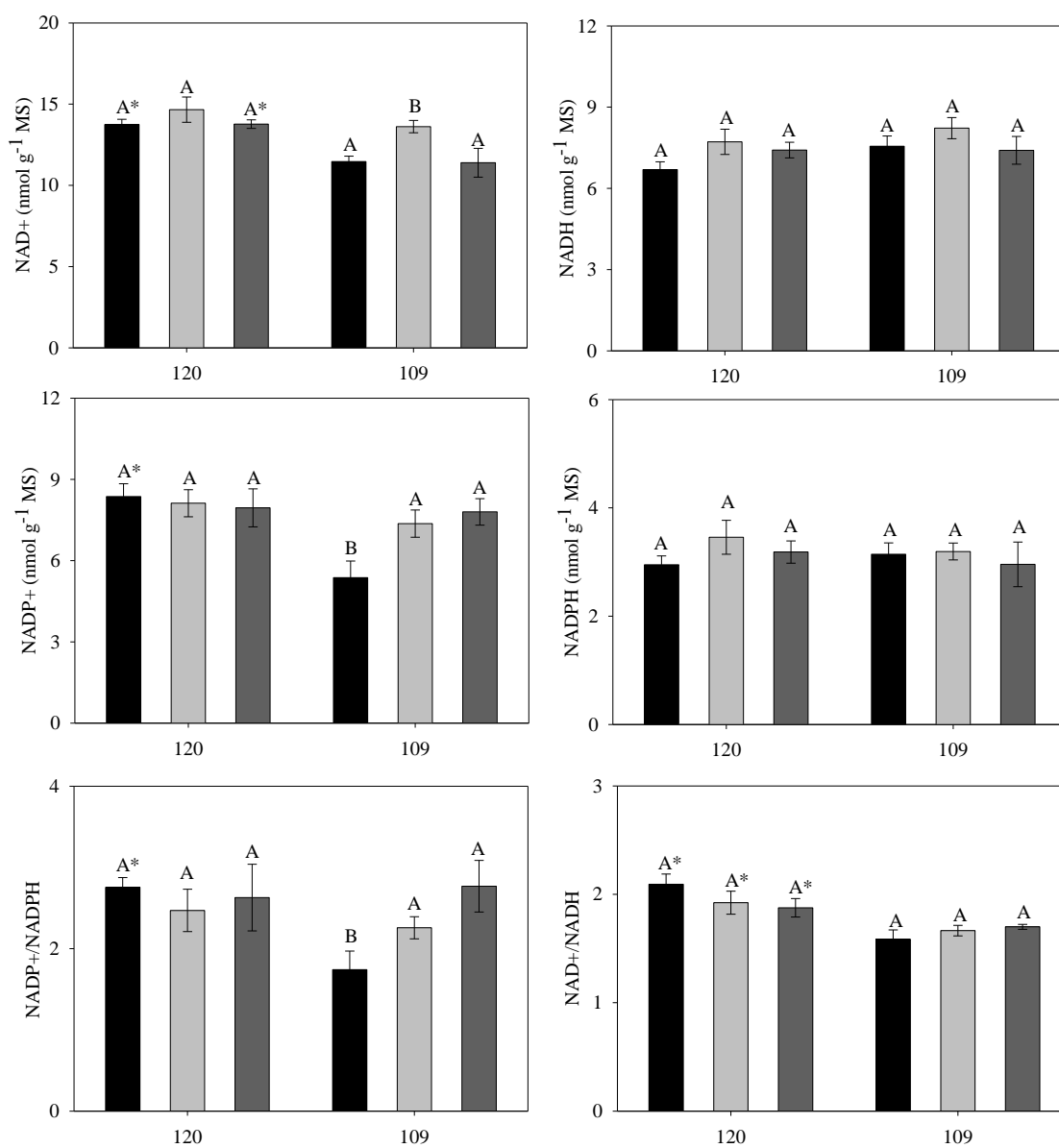


Figura 8. Estado redox celular. Concentrações foliares dos nucleotídeos NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH e razões entre NAD⁺/NADH e NADP⁺/NADPH em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT; barras negras) e expostos a um ciclo (C1; barras cinza-claro) ou a três ciclos de seca (C3; barras cinza-escuro). Valores são médias ± erro-padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro de um mesmo clone ($P \leq 0.05$; teste de Duncan), e asteriscos indicam diferenças entre os clones, dentro de um mesmo regime hídrico ($P \leq 0.05$; teste *t*).

3.7. Perfil metabólico

Para ter uma melhor perspectiva sobre as particularidades metabólicas dos dois clones e, principalmente, os ajustes adotados por cada um deles quando submetidos à seca, foi realizada uma análise de perfil metabólico foliar. Essa análise evidenciou uma profunda reprogramação metabólica nos clones de *C. canephora* expostos ao déficit hídrico, uma vez que, dos 42 metabólitos detectados, 34 tiveram seus níveis aumentados em pelo menos um dos tratamentos avaliados (Figura 9). De todas essas respostas, talvez as mais marcantes sejam as relacionadas ao metabolismo de aminoácidos. Com exceção da alanina e do triptofano, todos os demais aminoácidos tiveram seus níveis aumentados sob condições de seca, em pelo menos algum tratamento, em relação às plantas-controle (Figura 9). Ressalte-se que, nos dois clones, os aumentos de glicina foram muito superiores aos de serina e, com isso, a razão glicina/serina aumentou marcadamente sob seca, resultado que foi particularmente mais expressivo no clone 120 (Figura 9). Padrão semelhante de resposta também foi observado para a razão glutamina/glutamato; no entanto, o aumento dessa razão foi maior no clone 109 (Figura 9).

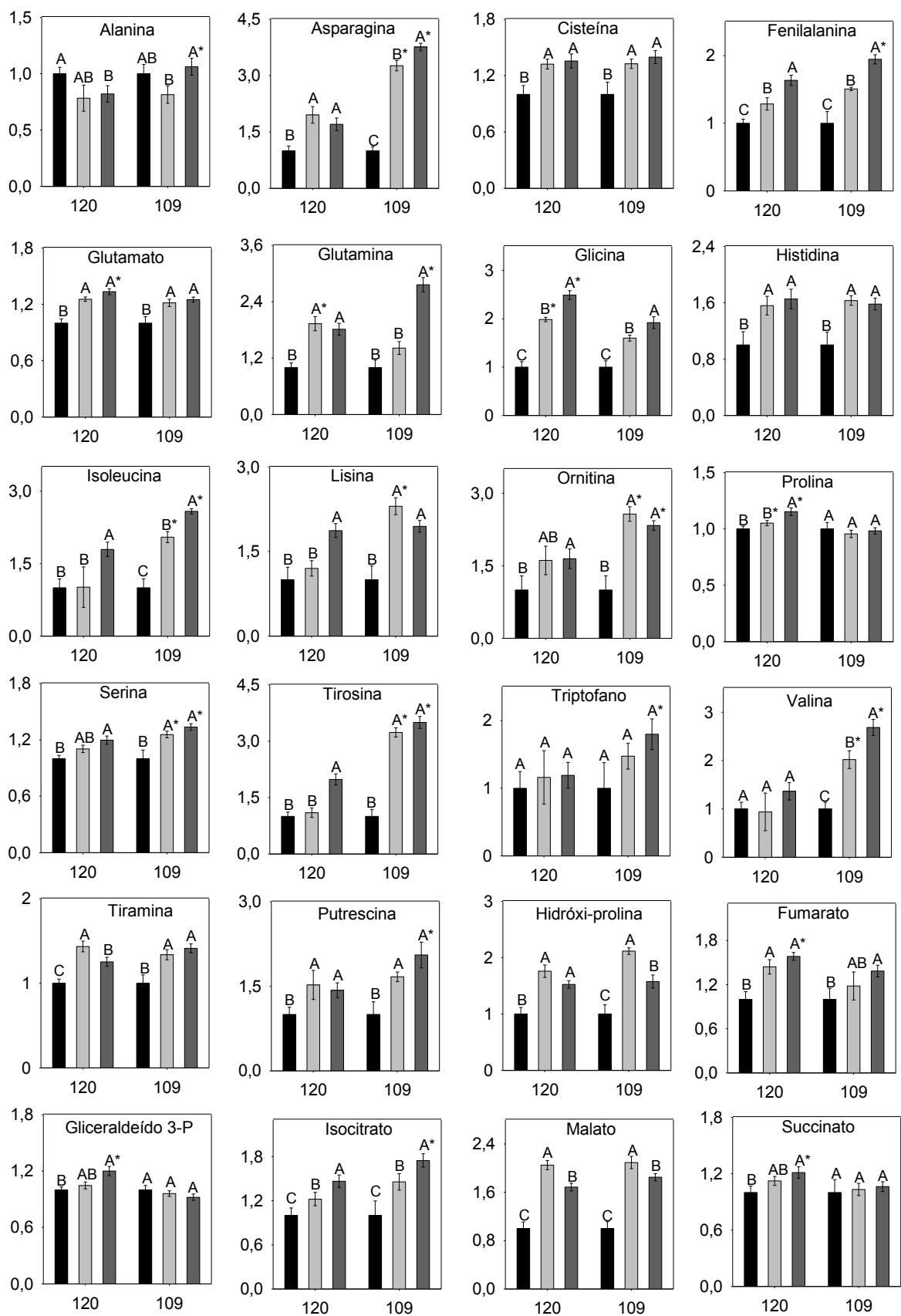
Com relação aos ácidos orgânicos envolvidos no TCA, a exposição à seca promoveu, de forma geral, aumentos nos níveis de fumarato, malato e isocitrato, em ambos os clones; enquanto aumentos nos níveis de succinato foram observados apenas nas plantas C3 do clone 120 (Figura 9). Além disso, no clone 120 também foram observados aumentos nos níveis de gliceraldeído 3-P e ácido fosfórico, enquanto no clone 109 houve aumento do ácido aspártico.

Os polióis glicerol, mio-inositol e manitol também tiveram seus níveis aumentados na seca, enquanto os níveis de galactinol foram reduzidos, em ambos os clones. Em relação aos açúcares, não foram observadas alterações nos níveis de rafinose, mas, por outro lado, houve aumento expressivo nos níveis de galactose nos dois clones (Figura 9).

Da mesma forma que o observado para os compostos do metabolismo primário, a exposição à seca também induziu aumentos nos níveis de alguns metabólitos secundários, entre eles naringerina, ácido nicotínico, ácido cinâmico e ácido trans-cafeico; no entanto, essas alterações foram significativas apenas nas plantas do clone 120 (Figura 9).

Saliente-se que muitas das respostas descritas acima foram diferencialmente expressas nas plantas expostas a múltiplos ciclos de seca. Em ambos os clones, as plantas

do tratamento C3 apresentaram maiores níveis de isocitrato, fenilalanina, glicina, isoleucina, glicerol, mio-inositol, ácido glutárico e galactose do que as plantas C1. Por outro lado, para alguns metabólitos, essas respostas foram específicas para cada clone. Nas plantas do tratamento C3 do clone 109, foram observados aumentos diferenciais de asparagina, glutamina, valina, fumarato e aspartato. É importante ressaltar que, no clone 120, o número de metabólitos diferencialmente modulados nas plantas C3 foi muito maior que no clone 109, com aumentos nos níveis de lisina, ornitina, prolina, serina, tirosina, gliceraldeído 3-P, glutarato, naringerina, mio-inositol e manitol, naringerina, ácido nicotínico, ácido fosfórico, gliceraldeído-3-P, ácido cinâmico e ácido trans-cafeico (Figura 9).



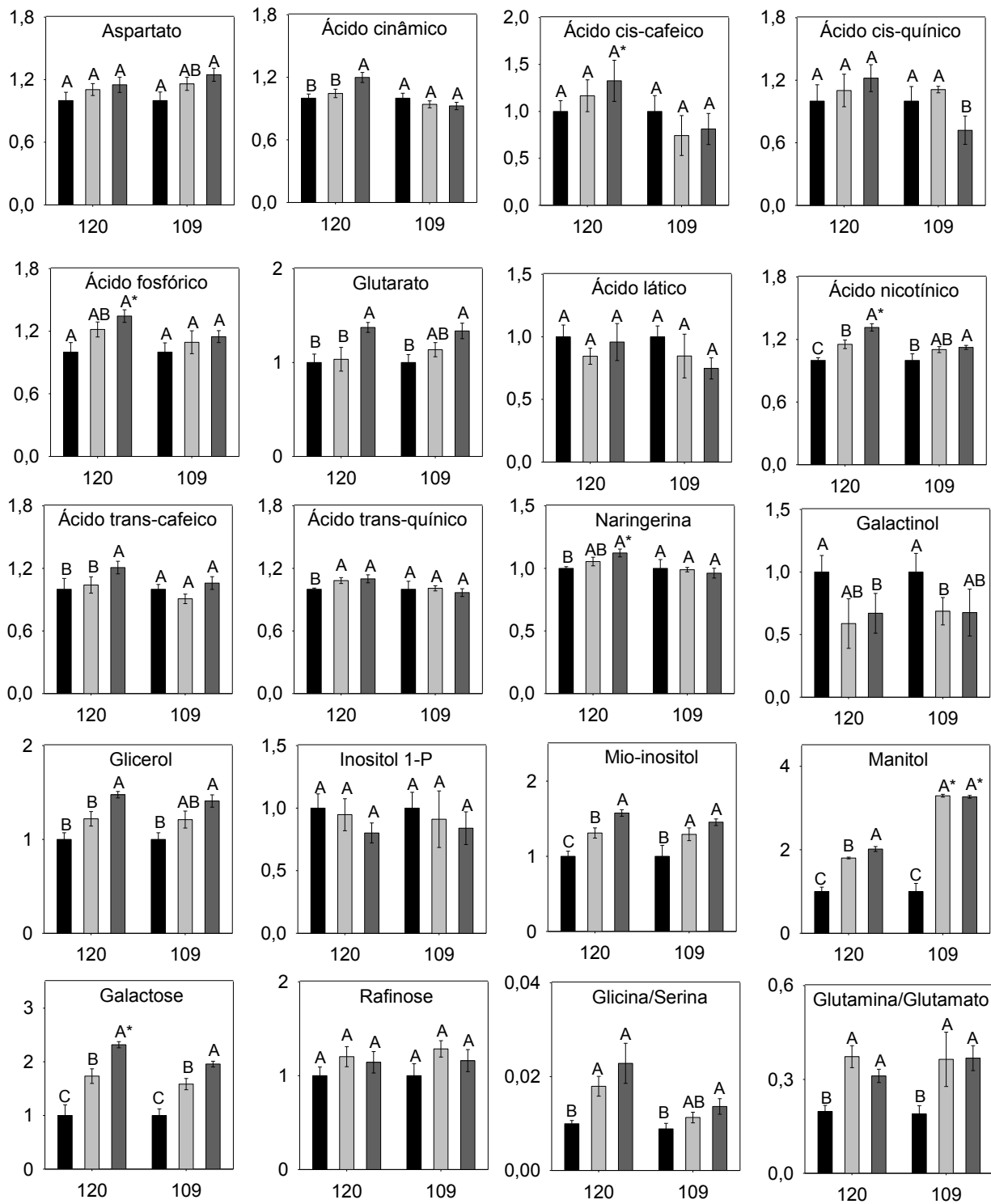


Figura 9. Perfil metabólico e razão entre os aminoácidos glicina/serina e glutamina/glutamato em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT) e expostos a um ciclo (C1) ou a três ciclos de seca (C3). Valores são médias \pm erro-padrão de sete repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro de um mesmo clone ($P \leq 0,05$; teste de Duncan), e asteriscos indicam diferenças entre os clones, dentro de um mesmo regime hídrico ($P \leq 0,05$; teste *t*). Para cada clone, os dados foram normalizados em relação à média das plantas-controle.

3.7. Relações entre as variáveis

Independentemente do regime hídrico, foi possível observar altas correlações positivas entre os componentes difusivos (A com g_s e R_n). Além disso, A e g_s também correlacionaram-se positivamente com os componentes hidráulicos (K_F , Ψ_{am} e Ψ_{md}) e com o nível de alguns carboidratos (sacarose, açúcares solúveis totais e amido). Por outro lado, A , g_s , K_F e carboidratos estiveram negativamente correlacionados com os níveis de aminoácidos totais e, também, com praticamente todos os aminoácidos detectados na análise de perfil metabólico; um mesmo padrão de resposta foi também observado para alguns ácidos orgânicos (isocitrato, malato e fumarato). A título de exemplo, as concentrações dos AAs isoleucina e valina correlacionaram-se negativamente com parâmetros que sinalizam disponibilidade de carbono (A e carboidratos). Por outro lado, os níveis de glicina estiveram negativamente associados com a atividade da enzima catalase (Figura 10).

Com o intuito de ter uma visão integrada das particularidades metabólicas de cada clone, entre os diferentes tratamentos, foi feita uma análise de componentes principais com os dados de perfil metabólico. Os dois primeiros componentes (CPs) explicaram 77.5% da variância total observada. Os resultados dessa análise permitiram observar a alta similaridade metabólica entre os dois clones, na condição irrigada (Figura 9). Além disso, também foi possível visualizar as profundas alterações metabólicas que a seca promoveu em ambos os clones, em relação às plantas-controle (Figura 9). Registre-se que, apesar do padrão comum de resposta entre os dois clones (visível no CP1), algumas particularidades entre eles foram observadas (CP2): as plantas do clone 120 estiveram mais fortemente relacionadas com alguns metabólitos secundários (ácido trans-quinico, ácidos cis e trans-cafeico, ácido cinâmico e naringerina), enquanto o clone 109 esteve mais fortemente relacionado com o ácido láctico, tiramina, ornitina histidina, tiramina e hidróxi-prolina. A análise de PCA também permitiu evidenciar o comportamento diferencial entre os ciclos de seca. Em ambos os clones, foi possível observar que grande parte das respostas metabólicas foi mais acentuada nas plantas expostas a múltiplos ciclos de seca do que nas plantas que experimentaram esse estresse pela primeira vez, principalmente no clone 120 (Figura 11).

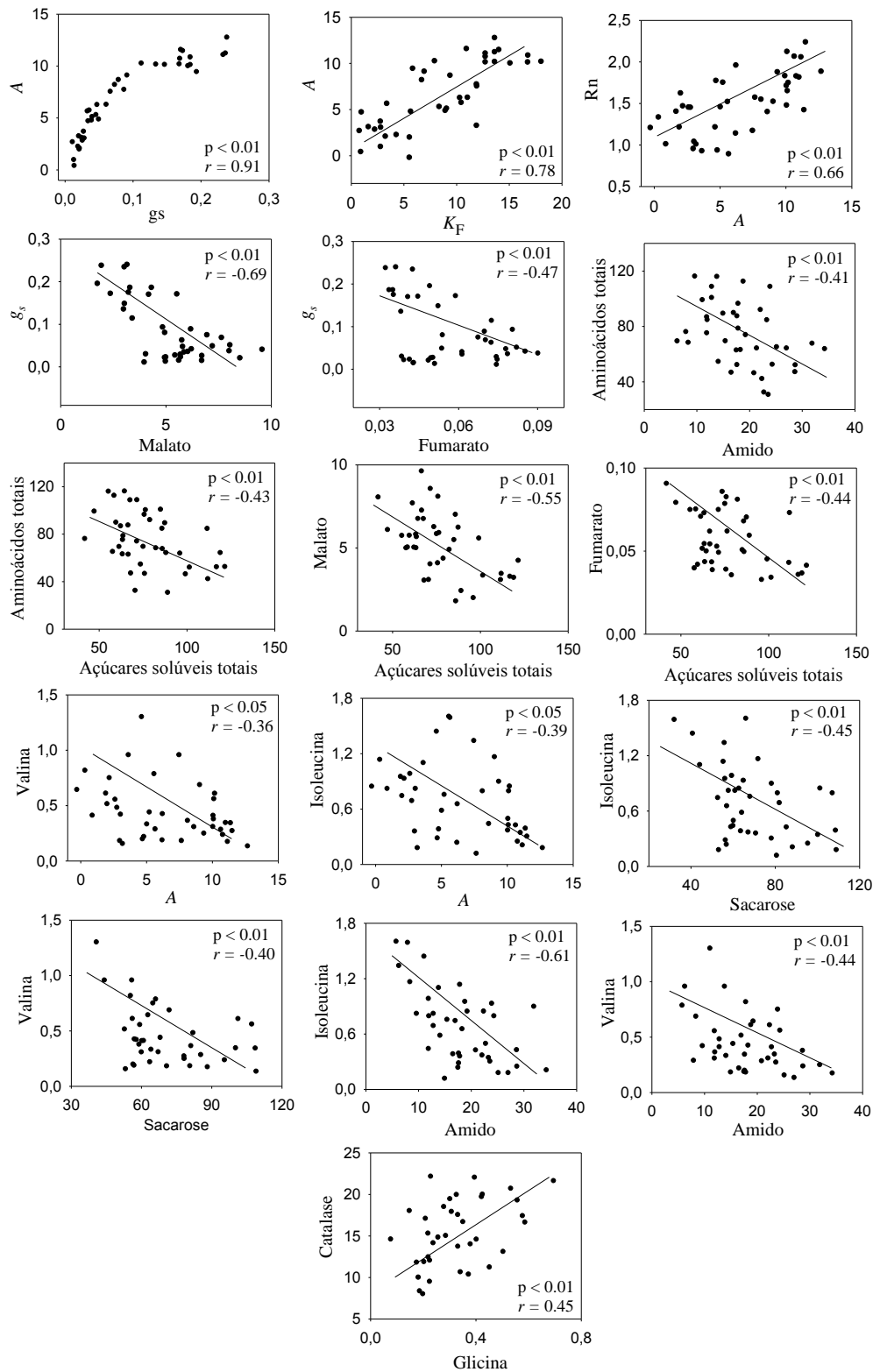


Figura 9. Coeficientes de correlação de Pearson entre variáveis fisiológicas e bioquímicas em clones de *C. canephora* nos diferentes tratamentos.

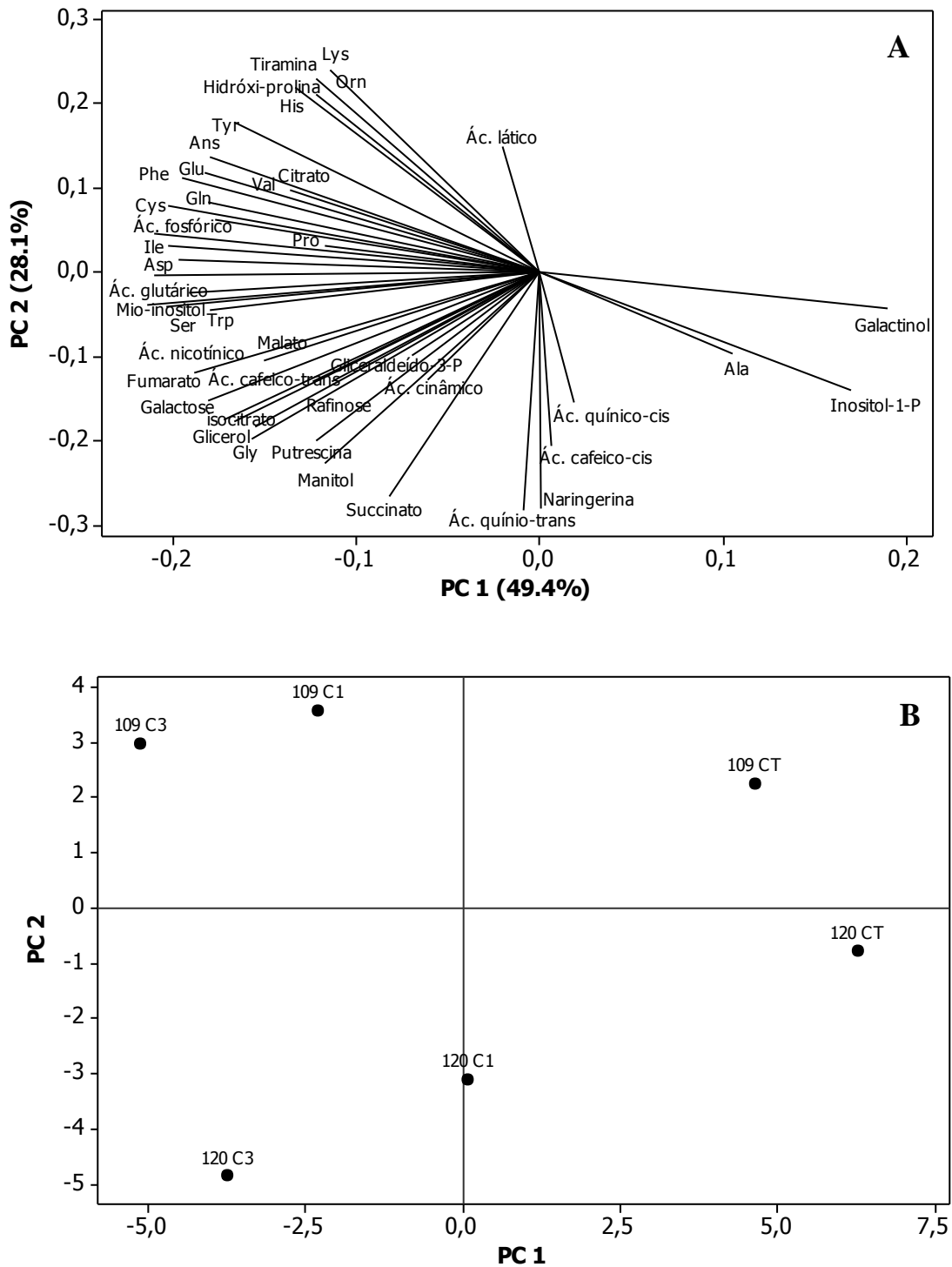


Figura 10. Análise dos dois primeiros componentes principais em dois clones de *C. canephora* continuamente irrigados (CT) e submetidos a um (C1) e três ciclos de seca (C3). Distribuição das variáveis (A) e dos clones (B) entre os dois primeiros componentes.

4 - DISCUSSÃO

A aclimação diferencial ou, como vem sendo chamada, a memória ao estresse, é um processo que só recentemente foi mais bem caracterizado em plantas (Kim et al., 2010). Contudo, a grande maioria dos trabalhos aborda esse processo de forma fragmentada, ou seja, centrando apenas na expressão de alguns genes ou em poucas respostas morfológicas. Diante desses fatos, um dos principais objetivos do presente trabalho foi apresentar uma visão integrada do processo de aclimação diferencial à seca. Como será demonstrado ao longo das próximas seções, as respostas das plantas de *C. canephora* expostas a múltiplos ciclos de déficit hídrico, quando comparadas com aquelas das plantas que experimentaram a seca pela primeira vez, foram potencializadas, conforme evidenciado pelas alterações em diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos. Além disso, o presente trabalho também apresenta uma visão geral das alterações metabólicas desencadeadas pela deficiência hídrica e o quanto a integração entre os metabolismos primário e secundário pode ser importante nessa situação.

Respostas hidráulicas, difusivas e bioquímicas de clones de *C. canephora* frente a múltiplos ciclos de exposição à seca

Em condições de ampla disponibilidade hídrica, não foram encontradas diferenças significativas de K_F entre os clones avaliados (Figura 3). De forma semelhante, também já foi demonstrado que, sob plena irrigação, os clones 120 e 109 apresentam apenas pequenas diferenças anatômicas de seus sistemas condutores (xilema e fibras) (Silva et al., 2013). Como a condutividade hidráulica é, em grande parte, um reflexo direto das propriedades anatômicas de uma planta (Santiago et al., 2004; Fichot et al., 2010), é muito provável que a ausência de diferença de K_F entre os clones seja o resultado da similaridade anatômica entre eles. Além disso, as correlações positivas encontradas entre os componentes hidráulicos e difusivos (Figura 10) sugerem que o K_F pode ter sido um dos principais determinantes das taxas fotossintéticas em ambos os clones. Essa resposta tem sido encontrada em vários trabalhos e evidencia o quanto as propriedades hidráulicas de uma planta podem afetar o seu potencial fotossintético (Brodrribb e Feild, 2000; Brodrribb et al., 2007). Por outro lado, quando submetidos à seca, os clones apresentaram comportamento hidráulico e difusivo muito distinto. Embora em ambos tenha havido reduções

significativas de K_F e A , tais reduções foram muito mais expressivas no clone 109 do que no clone 120 (Figura 3). A redução de K_F na seca tem sido um padrão comum de resposta encontrado em diversas espécies e está diretamente relacionada com o aumento da tensão exercida sobre os vasos do xilema que, em última instância, pode acarretar no rompimento da coluna d'água (cavitação) (Sperry et al., 1994; Sperry, 2000; Hacke et al., 2006). Como a cavitação tem um grande potencial em limitar o suprimento de água para as superfícies transpirantes, esse processo também tem sido apontado como um dos principais fatores associados com as reduções de g_s e, conseqüentemente, de A sob seca (Sperry, 2000; Sack e Holbrook, 2006; Sperry et al., 2008). Nesse sentido, a maior capacidade de manutenção de K_F , sob déficit hídrico, do clone 120, em relação à do clone 109, deve estar diretamente relacionada a uma menor ocorrência de cavitação e, provavelmente, foi um dos fatores preponderantes na divergência dos valores de g_s e A observada entre os clones na condição de déficit hídrico (Figura 4). Outra característica que pode ter conferido ao clone 120 uma maior eficiência hidráulica, em relação ao clone 109, é a presença de um sistema radicular mais robusto (Pinheiro et al., 2004), permitindo, assim, uma melhor exploração da água disponível no solo. Uma boa evidência da maior eficiência hidráulica do clone 120 reside no fato de que, embora ambos os clones tenham apresentado os mesmos valores de Ψ_{md} , o clone 120 foi capaz de exibir maiores valores de Ψ_{am} , para um mesmo conteúdo de água no solo (Figura 3), demonstrando uma maior capacidade de reidratação ao longo do dia.

A aclimatação à seca pode acarretar alterações anatômicas que tem o potencial de reduzir a vulnerabilidade à cavitação, resultando na manutenção do K_F e, conseqüentemente, das taxas fotossintéticas. Essas alterações geralmente envolvem a redução no diâmetro e aumento na frequência dos vasos do xilema (Fichot et al., 2010; Galmés et al., 2012). De fato, dentro de *C. canephora*, já foi observado que a tolerância à seca está diretamente relacionada com a capacidade em promover ajustes efetivos no sistema hidráulico (Silva et al., 2013). No entanto, a ocorrência desses ajustes varia com a intensidade, bem como com o tempo de exposição à seca (Fichot et al., 2010). No presente estudo, apesar de ter sido encontrada grande diferença na capacidade de manutenção de K_F entre os clones, saliente-se que não foram observadas variações desse parâmetro entre os ciclos de seca (Figura 3). Esse parece ser um bom indicativo de que os períodos de seca enfrentados pelas plantas, no decorrer dos três ciclos, foram longos o bastante para causar

alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares, porém, curtos o bastante para possibilitar ajustes anatômicos. Dessa forma, os maiores valores de A , sem quaisquer alterações em g_s , apresentados pelas plantas expostas a múltiplos ciclos de seca, em relação às plantas expostas a apenas um ciclo (Figura 4), parecem ter sido o resultado de ajustes moleculares e/ou bioquímicos e não estariam associadas a modificações no sistema hidráulico.

Um exemplo de ajuste bioquímico que pode ter contribuído para as maiores taxas de A nas plantas do tratamento C3 envolve aumentos na atividade da Rubisco (tratamento C3 de ambos os clones) sem, contudo, haver alterações em seu estado de ativação (Figura 4). Uma vez que a capacidade máxima de carboxilação (V_{cmax}) é uma função do produto entre a concentração da Rubisco, o estado de ativação e atividade catalítica (k_{cat}), isto é, $V_{cmax} = [Rubisco] \cdot \text{ativação} \cdot k_{cat}$, e considerando-se que k_{cat} é constante para café (3,25 s⁻¹; Martins et al., 2013), os resultados sugerem que houve um aumento de capacidade bioquímica de fixação de CO₂ associado com aumento de concentração da Rubisco nas plantas expostas a múltiplos eventos de seca. O aumento de concentração de Rubisco em resposta ao déficit hídrico é incomum (Galmés et al., 2011, 2013), e aqui se registra, pela primeira vez, que isso pode depender dos ciclos de seca impostos. Possivelmente, os decréscimos em g_s (visto neste estudo), associados com possíveis decréscimos na condutância mesofílica, já que ambas as condutâncias são correguladas (Martins et al., 2014), levaram a uma redução na concentração cloroplastídica de CO₂ (C_c), e o aumento da concentração de Rubisco poderia ser uma maneira de compensar este menor C_c (J. Galmés, comunicação pessoal. Outra hipótese seria a de que as plantas do tratamento C3, ao longo dos ciclos de seca, foram acumulando alterações epigenéticas que resultaram em uma maior expressão dos genes que codificam a Rubisco e/ou aquaporinas, mecanismo que aumentaria a capacidade de difusão e fixação de CO₂. No entanto, uma melhor compreensão dessa alteração na dinâmica da Rubisco só será possível com a análise dos dados de expressão gênica (RNAseq) e/ou de proteômica, que se encontram em desenvolvimento. Nesse sentido, o presente trabalho oferece uma perspectiva nova sobre a regulação da Rubisco, uma vez que os dados aqui apresentados apontam que o fator preponderante para essa resposta diferencial parece ter sido a exposição a múltiplos ciclos de seca.

Papel da respiração na manutenção de processos fisiológicos

Nos últimos anos, é cada vez maior o número de trabalhos que demonstram o quanto os processos respiratório e fotossintético são interdependentes (Nunes-Nesi et al., 2011). De fato, por catalisarem reações de vias opostas, esses dois processos precisam ser finamente regulados a fim de que seja mantida a homeostase celular, principalmente em condições de estresse (Araújo et al., 2014). No presente trabalho, as altas correlações positivas encontradas entre A e R_n (Figura 10) evidenciam, ainda que circunstancialmente, esse tipo de regulação. Além disso, nas plantas expostas à seca, também foram observados aumentos na atividade de algumas enzimas da glicólise e do TCA (Tabela 2). Essa indução na atividade enzimática esteve associada com reduções nos níveis de carboidratos e aumentos nas concentrações de aminoácidos totais (Figura 5) e de ácidos orgânicos (Figura 9). Estes dados, juntamente com as altas correlações negativas encontradas entre carboidratos com aminoácidos totais e ácidos orgânicos (Figura 10), permitem sugerir que o processo respiratório deve ter estado diretamente relacionado com o direcionamento de esqueletos de carbono para a biossíntese de compostos que são primordiais nas respostas à seca.

Um bom exemplo de intermediários do metabolismo mitocondrial envolvidos em respostas a estresses são os ácidos orgânicos malato e fumarato. Com efeito, já foram relatados aumentos desses metabólitos em diversas espécies expostas à seca (Guicherd et al., 1997; Alvarez et al., 2008; Charlton et al., 2008; Hummel et al., 2010), padrão de resposta que também foi observado no presente estudo (Figura 9). Uma das principais funções atribuídas a esses ácidos orgânicos é a de fonte alternativa de energia, principalmente em condições de privação de carbono (Araújo et al., 2011). As altas correlações negativas encontradas entre os níveis de carboidratos com o malato e fumarato evidenciam que o acúmulo desses compostos pode ter desempenhado um papel importante na regulação do balanço de carbono nas plantas de *C. canephora* expostas à seca (Figura 10). Outra importante função dos ácidos orgânicos que, apesar de ter sido especulada há bastante tempo, só recentemente foi melhor caracterizada, é a participação na regulação dos movimentos estomáticos (Patonnier et al., 1999; Araújo et al., 2011). Em um estudo envolvendo plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* com menor atividade da enzima succinato desidrogenase e, conseqüentemente, menores níveis de fumarato e malato, foram

observados aumentos significativos de g_s e A . Com essa descoberta os autores foram capazes de adicionar um novo nível de complexidade à dinâmica dos movimentos estomáticos (Araújo et al., 2011). De forma semelhante, independentemente do tratamento, também foram encontradas altas correlações negativas entre malato e fumarato com g_s e A (Figura 10). Estes resultados evidenciam que, além de outros reguladores clássicos, como o ABA, os ácidos orgânicos podem ter desempenhado um importante papel na modulação dos movimentos estomáticos nas plantas de *C. canephora*. Assim, quando analisados em conjunto, os presentes dados evidenciam, ainda que circunstancialmente, a importância do metabolismo mitocondrial na modulação do processo fotossintético, principalmente em condições de seca. Além disso, é importante salientar que algumas dessas respostas, principalmente as atividades enzimáticas, foram mais pronunciadas nas plantas do tratamento C3 de ambos os clones (Tabela 2), ressaltando que o processo respiratório também pode ter desempenhado papel decisivo nas respostas diferenciadas encontradas entre os ciclos de seca.

Reprogramação metabólica em condições de seca

A exposição à seca promoveu uma profunda alteração metabólica em ambos os clones. Dentre todas as alterações, talvez a mais marcante esteja relacionada com o metabolismo de aminoácidos. Confirmando o que foi observado nos níveis de aminoácidos livres totais (Figura 5), a análise de perfil metabólico revelou que, sob deficiência hídrica, houve aumento expressivo de praticamente todos os aminoácidos detectados (Figura 9). Essa indução na biossíntese de aminoácidos ressalta a importância desse grupo de moléculas no processo de tolerância à seca. Com efeito, ao longo das últimas décadas, diversos trabalhos têm apontado o papel dos aminoácidos em resposta a vários tipos de estresses, sejam eles bióticos ou abióticos (Greenway e Munns, 1980; Le Rudulier et al., 1984; Patonnier et al., 1999; Kocsy et al., 2005).

As correlações negativas encontradas entre os valores de A com os níveis dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACRs) isoleucina e valina (Figura 10) evidenciam que, na seca, os clones de *C. canephora* podem ter utilizado esses metabólitos como mecanismos alternativos de conservação e uso de energia. Resultados semelhantes foram observados em plantas de *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* expostas à seca em

que, além do acúmulo de ACRs, também foi observado um aumento na expressão dos genes relacionados com o catabolismo desses aminoácidos (Malastrasi et al., 2006). Esse padrão de resposta pode ser explicado pelo fato de que, em condições de privação de carbono, o catabolismo de ACRs poder direcionar elétrons direta ou indiretamente para a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, permitindo, assim, a manutenção adequada do processo respiratório (Araújo et al., 2010; Ishizaki et al., 2010). É importante ressaltar que, apesar de o acúmulo de ACRs ter ocorrido em ambos os clones, tais aumentos foram mais expressivos no clone sensível à seca do que no tolerante. Essa resposta diferencial pode estar relacionada ao fato de que, no clone 109, as reduções de A foram mais pronunciadas do que no clone 120 (Figura 4), caracterizando, assim, uma situação de maior privação de carbono. Essa hipótese parece ser confirmada pela alta correlação negativa desses ACRs com os metabólitos que sinalizam a disponibilidade de carbono (Figura 10) (amido, sacarose e açúcares solúveis totais). Dessa forma, os dados aqui apresentados permitem inferir que a biossíntese de ACRs pode ter funcionado como um efetivo mecanismo de defesa que teve como principal função o armazenamento de fontes alternativas de carbono, estratégia que pode ter uma importância ainda maior nos períodos de recuperação à seca (Malastrasi et al., 2006).

Com exceção do tratamento C3 do clone 120, a exposição ao déficit hídrico não promoveu alterações significativas nos níveis de prolina (Figura 9). Apesar de ser um dos aminoácidos mais bem estudados, o papel da prolina no processo de aclimação à seca ainda é tema controverso (Szabados e Saviouré, 2009). Isso ocorre porque, apesar de o acúmulo de prolina há muito tempo ser relacionado com a tolerância à seca (e.g. Hoekstra et al., 2001; Choudhary et al., 2005), em alguns trabalhos não se encontraram tais alterações (e.g. Silvente et al., 2012) (caso do presente estudo) e, em outros, foram observados até mesmo reduções desse metabólito (Shvaleva et al., 2008). Essa divergência na literatura deixa claro que essas respostas são dependentes da espécie, bem como possivelmente do tempo e da intensidade do estresse aplicado. Por outro lado, a exposição à seca promoveu um aumento marcante nos níveis de hidróxi-prolina, principalmente no clone 109 (Figura 10). A hidróxi-prolina é derivada da hidroxilação da molécula de prolina em uma reação catalisada pela enzima prolil hidroxilase; além disso, a hidróxi-prolina também serve como substrato de outra reação que culmina na formação de prolina-betaína

(Nolte e Hanson, 1997). Apesar de menos estudada, já foi demonstrado que a prolina betaína pode ser um osmólito mais eficiente do que a prolina (Servillo et al., 2011). Em adição, em um estudo envolvendo diversas variedades de citrus, também foi observado que plantas com os mesmos níveis de prolina podem apresentar diferentes concentrações de prolina-betaína; ressaltando que a alocação de prolina para a síntese de prolina-betaína pode ser muito variável, até mesmo entre cultivares da mesma espécie (Nolte e Hanson, 1997). Os dados do presente trabalho parecem seguir esse mesmo padrão de resposta, uma vez que, mesmo com pequenas alterações nos níveis de prolina, foram observadas grandes variações no intermediário hidroxiprolina. Dessa forma, é lícito sugerir que os incrementos nos níveis de hidroxiprolina estejam relacionados com o aumento na disponibilidade do intermediário para a síntese de prolina-betaína. É importante ressaltar que, além de participarem no ajustamento osmótico, a prolina, bem como seus intermediários, apresenta um papel de grande importância na dissipação do excesso de poder redutor, uma vez que a sua biossíntese consome grandes quantidades de NADPH (Sharma et al., 2011). Assim, quando analisados em conjunto, os dados apresentados sugerem que o metabolismo de prolina pode ter desempenhado um papel importante no processo de tolerância à seca dentro de *C. canephora*.

Independentemente do tratamento, não foram observadas alterações nos dados de $\Psi_{\pi 100}$, $\Psi_{\pi 0}$ e ϵ (Figura 3). Resposta semelhante foi encontrada por Pinheiro et al. (2004) ao trabalhar com os mesmos clones do presente trabalho, no entanto, com um déficit hídrico ainda mais acentuado. Estes resultados implicam na ausência de ajustamento osmótico. Registre-se que a grande maioria dos trabalhos aborda o ajustamento osmótico apenas no contexto bioquímico, ou seja, acúmulo de osmólitos compatíveis, enquanto poucos efetivamente medem o resultado fisiológico desse acúmulo. Por outro lado, levando em consideração a capacidade dos osmólitos compatíveis em alterar as propriedades osmóticas celulares (Szabados e Saviouré, 2010; An et al., 2013), como é possível que o aumento na biossíntese desses metabólitos (Figura 9) não tenha alterado os valores de $\Psi_{\pi 100}$ e $\Psi_{\pi 0}$ (Figura 3)? A resposta para essa pergunta parece envolver um mecanismo de compensação ou interconversão entre as formas desses osmólitos. De fato, quando analisados em conjunto, os dados do presente trabalho evidenciam que a produção de compostos com propriedades osmóticas (hidróxi-prolina, galactose, manitol, glicerol, mio-inositol, malato e

fumarato) (Figura 10) parece ter envolvido o consumo direto de carboidratos, principalmente a sacarose (Figura 5). Uma vez que a sacarose é um dos principais reguladores osmóticos celulares, o consumo dessa molécula para a produção de outros osmólitos pode ter tamponado as variações de $\Psi_{\pi 100}$ e $\Psi_{\pi 0}$. É importante ressaltar que, além da manutenção da turgescência celular, outras funções que têm sido atribuídas a esses metabólitos é a de detoxificação de espécies reativas de oxigênio e, também, a estabilização de proteínas e membranas (Hoekstra e Buitink, 2001; Williamson et al., 2002). Nesse sentido, parece provável que a produção da vasta gama de osmólitos compatíveis na seca esteja relacionada, primordialmente, com mecanismo de proteção, em vez da manutenção da turgescência celular. Destaque-se que, apesar de o acúmulo de osmólitos compatíveis ter sido um padrão geral das plantas expostas ao déficit hídrico, tais aumentos foram mais expressivos nas plantas do tratamento C3 de ambos os clones (Figura 10). Dessa forma, é lícito sugerir que os reajustes metabólicos que culminaram na maior produção de osmólitos compatíveis também podem ter estado envolvidos com o comportamento diferencial das plantas expostas a múltiplos eventos de seca.

Soluções alternativas para um mesmo problema: mecanismos de defesa e de dissipação de energia em condições de seca

Pelo fato de a fotossíntese ser um dos principais drenos de elétrons nos cloroplastos, as grandes reduções desse processo em condições de déficit hídrico (Figura 4) pode ter gerado um quadro potencialmente danoso ao metabolismo celular (Assada, 2006). Isso porque, nessas situações, as plantas tendem a absorver uma quantidade de energia maior do que são capazes de utilizar, gerando, assim, um desbalanço energético que é um dos principais responsáveis pelo aumento de produção de EROs (Assada, 2006; Noctor et al., 2014). Contudo, foi observado que as plantas de *C. canephora* exibiram uma série de mecanismos que minimizaram a geração e/ou aumentaram a capacidade de remoção das EROs. Evidências da efetividade desses mecanismos de defesa podem ser observadas pela ausência de variação nos níveis de MDA entre os tratamentos (Figura 7), resultado que indica que a seca não potencializou a ocorrência de danos celulares. Além disso, também não foram observadas variações significativas nos valores de F_v/F_m (Tabela 1), outro indicativo de que as plantas expostas ao déficit hídrico não sofreram fotoinibição. Em

conjunto, estes dados permitem inferir que os mecanismos de defesa, discutidos a seguir com mais detalhes, concorreram ativamente para a manutenção da integridade dos fotossistemas e, também, da homeostase celular.

O aumento marcante na atividade das enzimas SOD, APX, GR e CAT nas plantas expostas à seca (Figura 7), de ambos os clones, evidencia a ativação dos mecanismos enzimáticos de defesa contra as EROs. Essas enzimas, além de participarem diretamente na remoção de EROs, também estão associadas a processos que dissipam o excesso de poder redutor. As enzimas SOD, APX e GR, por exemplo, estão envolvidas na chamada reação de Mehler, em que elétrons da cadeia de transporte de elétrons cloroplastídica são transferidos ao oxigênio molecular que é, então, convertido a água (Noctor et al., 2014; Asada, 1999). A catalase, por sua vez, está normalmente relacionada à detoxificação de processos como a fotorrespiração (descrito mais abaixo) e a beta-oxidação (Florian et al., 2013). Diversos estudos relatam que o aumento na atividade dessas enzimas constitui a primeira e, também, a principal linha de defesa contra o estresse oxidativo (Asada 1999, Faize et al., 2011; Ma et al., 2011). De fato, em alguns trabalhos envolvendo plantas mutantes que apresentam maior atividade dessas enzimas foi observado um aumento expressivo na tolerância à seca (Faize et al., 2011). Ressalte-se que, em ambos os clones, o aumento na atividade das enzimas CAT e GR foi maior nas plantas do tratamento C3 do que nas do tratamento C1 (Figura 7). Esse resultado compõe mais uma evidência de que as plantas expostas a múltiplos ciclos de seca foram capazes de potencializar os mecanismos de defesa contra os efeitos deletérios da seca, quando comparadas a plantas submetidas à seca pela primeira vez.

Apesar de ser um dos temas mais controversos da fisiologia vegetal, alguns estudos recentes têm apontado a importância da fotorrespiração na manutenção de diversos processos metabólicos, principalmente em condições estressantes (Ferne et al., 2013; Florian et al., 2013). Nesse contexto, o presente trabalho apresenta algumas evidências do aumento do processo fotorrespiratório nas plantas expostas à seca. A primeira delas envolve o aumento na razão glicina/serina (Figura 9), aminoácidos que são um dos principais produtos da fotorrespiração. Com efeito, o aumento nessa razão é um dos melhores indicativos metabólicos da variação na atividade fotorrespiratória (Wingler et al., 1999; Novitskaya et al., 2002). Além disso, esses aminoácidos estão diretamente

relacionados com a biossíntese de certos compostos de defesa, tais como a glutatona (poderoso antioxidante) e glicina-betaína (importante osmólito compatível) (Novitskaya et al., 2002). As altas correlações positivas entre a concentração de glicina e a atividade da enzima catalase (Figura 9) é outra evidência do aumento da atividade fotorrespiratória das plantas expostas à seca, principalmente no clone 120. De fato, durante a reação de conversão de glioxilato a glicina, catalisada pela enzima glicolato oxidase, ocorre grande produção de H_2O_2 , produto altamente tóxico que é prontamente convertido a H_2O pela enzima catalase (Florian et al., 2013). Assim, parece provável que os clones de *C. canephora* foram capazes de balancear os efeitos nocivos da alta taxa de produção de glicina por meio de ajustes finos da atividade da catalase. Outro efeito benéfico que tem sido atribuído à fotorrespiração é a dissipação do excesso de energia de excitação da cadeia de transporte de elétrons cloroplastídica. Esse mecanismo também parece ter operado nas plantas de *C. canephora* expostas à seca, principalmente no clone 109, uma vez que foram observados aumentos na razão J_o/J_c e R_p/A_b (Tabela 1), parâmetros que indicam um direcionamento de maior proporção de elétrons para o processo fotorrespiratório (Bai et al., 2008). Saliente-se que, em ambos os clones, algumas dessas respostas foram mais pronunciadas nas plantas do ciclo C3 (Tabela 1), resultados que ressaltam o papel da fotorrespiração no comportamento diferencial encontrado nas plantas expostas a múltiplos ciclos de seca.

Como dito anteriormente, os aminoácidos podem desempenhar papel fundamental nos processos de detoxificação celular. No entanto, o aumento na biossíntese desses metabólitos, observado nas plantas expostas à seca (Figuras 5 e 10), provavelmente demandou uma maior quantidade de nitrogênio pelas folhas. Essa hipótese parece ter sido confirmada, uma vez que, em ambos os clones, foram observados aumentos na razão glutamina/glutamato (Figura 10), resultado que evidencia uma maior incorporação de nitrogênio nas plantas expostas à seca (Wingler et al., 1999). Por outro lado, esses dados contrastam com algumas observações de que a seca tende a reduzir as taxas de assimilação e, também, a translocação de nitrato para as folhas (Shaner and Boyer, 1976; Ferrario-Méry et al., 1998; Buljovic e Engels, 2001). Dessa forma, é possível que os clones de *C. canephora* tenham utilizado mecanismos alternativos para manter a disponibilidade de nitrogênio para a biossíntese de aminoácidos, além de outros compostos nitrogenados,

papel que também pode ter sido realizado pela fotorrespiração (Foyer et al., 2003). De fato, alguns estudos já demonstraram que a refixação de nitrogênio no chamado “ciclo do nitrogênio fotorrespiratório” pode ser muito maior que a assimilação de nitrato pelas raízes (Ferne et al., 2013). Além disso, também já foi observado que em plantas mutantes com menor atividade fotorrespiratória houve redução nos níveis de nitrato e, conseqüentemente, de aminoácidos, resultados que ligam diretamente a fotorrespiração com o metabolismo do nitrogênio (Ferrario-Méry et al., 1998). No presente trabalho, de todos os aminoácidos detectados, o único que teve reduções significativas na seca, principalmente no clone 120, foi a alanina (Figura 8), principal doador de grupo amino para a manutenção da fotorrespiração (Betsche, 1986; Ta e Joy 1986). Estes resultados, juntamente com o aumento nas razões glicina/serina, J_o/J_c e R_p/A (Tabela 1), reforçam ainda mais as evidências do aumento da fotorrespiração nas plantas de *C. canephora* expostas à seca. Quando analisados em conjunto, os dados aqui apresentados apontam que o processo fotorrespiratório, além de ter atuado como importante componente nos mecanismos de dissipação de energia, também pode ter sido fundamental na manutenção da biossíntese de aminoácidos na seca.

Dentre todas as linhas de defesa contra as ROS, os metabólitos secundários são os mais comumente negligenciados. Por outro lado, já foi comprovado que alguns compostos fenólicos apresentam uma capacidade antioxidante maior que a do próprio ácido ascórbico, um dos principais antioxidantes celulares (Grace e Logan, 2000). Outro ponto importante relacionado à biossíntese desses metabólitos envolve o grande consumo de poder redutor (Maeda e Dudareva, 2012). Nesse contexto, além de poderosos antioxidantes, os compostos secundários também podem atuar como válvulas dissipadoras do excesso de energia de excitação das cadeias de transporte de elétrons. No presente trabalho, uma tendência geral de resposta das plantas expostas à seca foi o aumento na biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina (Figura 9). Essa resposta também foi acompanhada por incrementos nos níveis de alguns metabólitos secundários (e.g. ácido cinâmico, ácido trans-cafeico, naringerina e cafeína), principalmente no clone 120 (Figura 9). Em conjunto, estes dados indicam que a seca induziu um maior fluxo de carbono para a via do xiquimato, uma das principais rotas envolvidas com a produção de compostos secundários (Maeda e Dudareva, 2012). Mencione-se que todas as respostas descritas acima foram mais

pronunciadas nas plantas C3 do clone 120 (Figura 9). Assim, fica claro que o metabolismo de fenóis, além de ser um componente alternativo ao combate dos efeitos deletérios da seca, também parece ter contribuído ativamente para o comportamento diferencial das plantas dos tratamentos C3.

Os resultados do presente trabalho evidenciam as diversas estratégias que parecem ter sido utilizadas pelos clones de *C. canephora* para dissipar o excesso de energia de excitação das cadeias de transporte de elétrons cloroplastídica e mitocondrial, quando submetidos à seca. A efetividade dessas verdadeiras “válvulas metabólicas” pode ser melhor observada pelas razões NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, dados que sinalizam o estado redox celular (Figura 8). No clone 120, independentemente do tratamento, não foram observadas variações nessas razões, resultados que indicam que os mecanismos de dissipação foram capazes de contrabalancear as reduções de A e, conseqüentemente, mitigar o acúmulo de poder redutor (Figura 8). A mesma tendência de resposta também foi observada no clone 109 para a razão NAD^+/NADH ; no entanto, nesse mesmo clone, foram observados aumentos na razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ nas plantas expostas à seca (Figura 8). Este padrão de resposta do clone 109 pode ser um reflexo direto das fortes reduções de ETR associada com o aumento na biossíntese de compostos dissipadores, o que, em última instância, pode ter culminado com o acúmulo de NADP^+ (Figura 8). Dessa forma, estes dados evidenciam que, apesar das grandes alterações metabólicas causadas pela seca, ambos os clones foram, de forma geral, capazes de minimizar as variações no estado redox celular.

Quando analisados em conjunto, os diversos mecanismos de defesa apresentados evidenciam a capacidade de flexibilidade metabólica de plantas sujeitas a condições estressantes. Nesse sentido, ficou claro que a manutenção da homeostase celular na seca demandou a ação de mecanismos que envolveram desde a modulação de algumas enzimas, até a biossíntese de compostos que, além de reguladores, também são potentes antioxidantes. Dessa forma, os mecanismos de defesa descritos acima deixam clara a importância da integração metabólica no processo de aclimação ao déficit hídrico, uma vez que os mecanismos de defesa envolveram a participação conjunta dos metabolismos primário (fotossíntese, fotorrespiração e respiração) e secundário (biossíntese de fenóis).

Plasticidade metabólica em *C. canephora*

Como acima demonstrado, grande parte das alterações fisiológicas e, principalmente, metabólicas encontradas neste trabalho foi mais expressiva no clone sensível (109) do que no clone tolerante (120). Apesar de parecer contraditório, *a priori*, esse padrão de resposta evidencia ainda mais a maior tolerância à seca do clone 120. De fato, diversos trabalhos têm encontrado que a principal característica de plantas tolerantes a determinados tipos de estresse é a estabilidade de resposta nessas condições, ou seja, uma menor plasticidade fenotípica (Nicotra et al., 2010; Couso e Fernández, 2012). Essa indução metabólica diferencial encontrada entre os clones parece ser um reflexo direto das propriedades hidráulicas de cada um deles. Nesse sentido, a maior capacidade de manutenção do K_F (Figura 3), além de um sistema radicular mais robusto (Pinheiro et al., 2005), permitiram ao clone 120 uma melhor hidratação de seus tecidos e, conseqüentemente, uma menor exigência de ajustes metabólicos. Por outro lado, no clone 109, a presença de um sistema hidráulico menos eficiente levou a um maior desbalanço hídrico que, por sua vez, demandou um maior grau de ajustes em nível de respostas bioquímicas. Estes resultados evidenciam que, apesar de os mecanismos bioquímicos e moleculares terem um papel fundamental nos processos de proteção celular, em última instância, talvez os principais determinantes do desempenho de uma planta sejam os seus componentes estruturais (Brodribb, 2009).

É possível aprender com a seca? Causas e conseqüências da aclimatação diferencial a seca em plantas de *C. canephora* expostas a múltiplos eventos estressantes.

Uma das principais questões levantadas no presente trabalho foi se plantas de *C. canephora* expostas a múltiplos ciclos de seca seriam capazes de apresentar mecanismos de resposta em maior magnitude em relação a plantas expostas à seca pela primeira vez. Os resultados obtidos sugerem, a princípio, uma resposta positiva à indagação supracitada (Figura 11) e, além disso, demonstram que essas respostas diferenciais ocorreram em mecanismos fisiológicos (fotossíntese), bioquímicos (algumas envolvidas na glicólise, TCA e estresse oxidativo) e metabólicos (diversos compostos do metabolismo primário e secundário). Todo esse conjunto de respostas permitiu às plantas do tratamento C3, principalmente as do clone 120, apresentarem maiores taxas de A do que as plantas do

tratamento C1 (Figura 4). Como a fotossíntese é um dos processos que mais bem integra o estado fisiológico de uma planta, é possível dizer que as plantas do tratamento C3 tiveram um melhor desempenho na seca do que as plantas do tratamento C1 (Figura 4). No entanto, como parece improvável que os componentes hidráulicos estejam relacionados com tais respostas diferenciais, qual seria a explicação para o comportamento observado nas plantas do tratamento C3? A resposta para esta pergunta pode estar diretamente relacionada com a geração de alterações epigenéticas. De fato, uma série de trabalhos tem evidenciado que as alterações na estrutura da cromatina podem deixar o material genético em um estado de “alerta” e, conseqüentemente, potencializar as respostas frente a estresses recorrentes (Bird, 2007; Kim et al., 2010; Ding et al., 2012; Goh et al., 2003). No entanto, a grande maioria desses trabalhos tem como principal foco a expressão de alguns genes. Nesse sentido, o presente trabalho é um dos primeiros a demonstrar de forma integrada o processo de aclimação diferencial à seca.

Outra hipótese levantada foi a de que plantas do tratamento C3 do clone tolerante seriam capazes de acumular um maior número de respostas diferenciais em relação às plantas do clone sensível. Essa hipótese também parece ter sido confirmada, uma vez que, de todos os parâmetros avaliados, 39% foram diferencialmente expressos nas plantas C3 do clone 120, enquanto apenas 24% foram observados nas plantas do clone 109. Estes dados, ainda que de forma circunstancial, permitem inferir que a geração de alterações epigenéticas pode ter ocorrido em maior extensão no clone tolerante. Vale lembrar que a geração de alterações epigenéticas envolve um sofisticado sistema enzimático capaz de introduzir e remover alterações covalentes na estrutura da cromatina (Sokolet al., 2007; Bird, 2007). Nesse sentido, parece provável que o maior número de respostas diferenciais observadas no clone 120, em relação ao do clone 109, pode estar relacionado a um sistema de geração de alterações epigenéticas mais efetivo.

Apesar de o presente estudo oferecer uma perspectiva mais ampla do processo de aclimação diferencial à seca, ainda são necessárias análises mais aprofundadas (e.g. imunoprecipitação de cromatina) para o melhor entendimento da geração e regulação dos mecanismos de “memorização” ao estresse. Os resultados desse tipo de estudo podem ter uma grande implicação nos programas de melhoramento genético. Um exemplo prático da aplicação dos resultados desse tipo de estudo seria a geração de plantas transgênicas que

constitutivamente teriam maior expressão de genes que codificam as maquinarias que controlam as alterações epigenéticas. Dessa forma, seria possível obter plantas que naturalmente apresentem alterações na estrutura da cromatina necessárias para deixar o material genético em um estado de “alerta” constante contra a seca, permitindo, assim, respostas de defesa mais rápidas e efetivas.

5 - REFERÊNCIAS

Abou-Aziz AB, El-Nataway SM, Adel-Wahab FK, Kader AA (1976) The effect of storage temperature on quality and decay percentage of 'Pai' and 'Taimour' mango fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **5**: 65-72.

Alvarez S, Marsh EL, Schroeder SG, Schachtman DP (2008) Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, Cell and Environment*, **31**: 325-340.

An Y, Zhang M, Liu G, Han R, Liang Z (2013) Proline accumulation in leaves of *Periploca sepium* via both biosynthesis up-regulation and transport during recovery from severe drought. *Plos One*, **8(7)**: 1-10.

Anderson, MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiology*, **109**: 1247-1257.

Antunes WC, Pompelli MF, Carretero DM, DaMatta FM (2008) Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). *Annals of Applied Biology*, **153**: 33-40.

Ashihara H, Sano H, Crozier A (2008) Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, **69**: 841–856.

Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, Leaver CJ, Fernie AR (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-Coadehydrogenases as alternative electron donors

linking lysine catabolism to the electron transport chain of *Arabidopsis* mitochondria. *The Plant Cell*, **22**: 1549-1563.

Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie RA (2011) Protein degradation an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science*, **16 (9)**: 489-498.

Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR (2014) On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth. *Photosynthesis Research*, **119**: 141-156.

Assada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 601-639.

Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, **141**: 391-396.

Bai J, Xu DH, Kang HM, Chen K, Wang G (2008) Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. *Photosynthetica*, **46 (2)**: 232-237.

Bartoli CG, Gomez F, Gergoff G, Guiamét J, Puntarulo S (2005) Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 1269-1276.

Barsalobres-Cavallari CF, Severino FE, Maluf MP, Maia IG (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology*, **10(1)**:1-10.

Barros RS, Maestri M, Rena A (1994) Purine alkaloids in *Coffea*. *Journal of Coffee Research*, **24**: 55-86.

Bates LS (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39**: 205-207.

- Benzie IFF, Strain JJ** (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**: 70-76.
- Betsche T** (1983) Aminotransfer from alanine and glutamate to glycine and serine during photorespiration in oat leaves. *Plant Physiology*, **71**: 961-965.
- Bird A** (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature*, **447**: 396-398.
- Boyer JS** (1970) Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology*, **46**: 233-235.
- Buljovic Z, Engels C** (2001) Nitrate uptake ability by maize roots during and after drought stress. *Plant and Soil*, **229**: 125–135.
- Brodrribb TJ, Feild TS** (2000) Stem hydraulic supply is linked to leaf photosynthetic capacity: evidence from New Caledonian and Tasmanian rainforests. *Plant, Cell and Environment*, **23**: 1381-1388.
- Brodrribb TJ, Holbrook NM** (2003) Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiology*, **132**: 2166-2173.
- Brodrribb TJ, Taylor SF, Gregory JJ** (2007) Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant Physiology*, **144**: 1890-1898.
- Brodrribb TJ** (2009) Xylem hydraulic physiology: The functional backbone of terrestrial plant productivity. *Plant Science*, **177**: 245-251.
- Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA** (2007) Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, **173**: 603-608.
- Cakmk I, Horst J** (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, **83**: 463-468.
- Castelluccio C, Paganga G, Melikian n, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Rice-Evans R** (1995) Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters*, **368**: 188-192.

Cornic G, Briantais J (1991) Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C3 leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. *Planta*, **183**: 178-184.

Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Sciences*, **5**: 187-188.

Cornic G, Fresneau C (2002) Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany*, **89**: 887-894.

Couso LL, Fernández RJ (2012) Phenotypic plasticity as an index of drought tolerance in three Patagonian steppe grasses. *Annals of Botany*, **110**: 849-857.

Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, **55**: 2365-2384.

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**: 551-560.

Charlton AJ, Donarski J, Harison M, Jones SA, Godward J, Oehlschalger S, Arques JL, Ambrose M, Chinoy C, Mullineaux PM, Domoney C (2008) Responses of the pea (*Pisum sativum* L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonancespectroscopy. *Metabolomics*, **4**: 312-327.

DaMatta FM, Maestri M, Barros RS, Regazzi AJ (1993) Water relations of coffee leaves (*Coffea arabica* and *C. canephora*) in response to drought. *Journal of Horticultural Science*, **68**: 741-746.

DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*, **159**: 975-981.

DaMatta FM (2004) Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **16(1)**: 1-6.

DaMatta FM, Ramalho JDC (2006) Impact of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **18**: 55-81.

DaMatta FM, Ronchi CP, Maestri M, Barros RS (2007) Ecophysiology of coffee growth and production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **19**: 485-510.

Davis AP, Govaerts R, Bridson DM, Stoffelen P (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **152**: 465-512.

Ding Y, Fromm M, Avramova Z (2012) Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, **3**: 1-9.

Elthon TE, Nickels RL, McIntosh I (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiology*, **89**: 1311-1317.

Epron D, Dreyer E (1993) Long-term effects of drought on photosynthesis of adult oak trees [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L.] in a natural stand. *New Phytologist*, **125**: 381-389.

Epron D, Godard D, Cornic G, Genty B (1995) Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistances to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant, Cell and Environment*, **18**: 43-51.

Faize M, Burgos L, Faize L, Piqueras A, Nicolas E, Barba-Espin G, Clemente-Moreno MJ, Alcobendas R, Artlip T, Hernandez JA (2011) Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*, **62** (8): 2599-2613.

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, **212**: 250-263.

Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *The Plant Cell*, **23**: 2477-2482.

Fernie AR, Bauwe H, Eisenhut M, Florian A, Hanson DT, Hagemann M, Keech O, Mielewczik M, Nikoloski Z, Peterhansel C, Roje S, Sage R, Timm S, von Cammerer S, Weber APM, Westhoff P (2013) Perspectives on plant photorespiratory metabolism. *Plant Biology*, **15**: 748-753.

Ferrario-Méry S, Valadier MH, Foyer CH (1998) Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiology*, **117**: 293-302.

Florian A, Araújo WL, Fernie AR (2013) New insights into photorespiration obtained from metabolomics. *Plant Biology*, **15**: 656-666.

Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey, TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, **6**: 269-279.

Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbó M (2006) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*, **127**: 343-352.

Flexas J, Díaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbó M (2007a) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant, Cell and Environment*, **10**: 1284-1298.

Flexas J, Díaz-Espejo A, Berry JA, Cifre J, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbó M (2007b) Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 1533-1543.

Flexas J, Baro M, Bota J, Ducruet JM, Galle A, Gasmés J, Jiménez M, Pou A, Ribas-Carbó M, Sajnani C, Tomàs M, Medrano H (2009) Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 2361-2377.

Fichot R, Laurans F, Monclus R, Moreau A, Pilate G, Brignolas F (2009) Xylem anatomy correlates with gas exchange, water-use efficiency and growth performance under contrasting water regimes: evidence from *Populus deltoides* x *Populus nigra* hybrids. *Tree Physiology*, **29(12)**: 1537-1549.

Foyer CH, Parry M, Noctor G (2003) Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 585-593.

Gallé A, Feller U (2007) Changes of photosynthetic traits in beech saplings (*Fagus sylvatica*) under severe drought stress and during recovery. *Physiologia Plantarum*, **131**: 412-421.

Gallé A, Florez-Sarasal I, Aououadi HE, Flexas J (2011) The Mediterranean evergreen *Quercus ilex* and the semi deciduous *Cistus albidus* differ in their leaf gas exchange regulation and acclimation to repeated drought and re-watering cycles. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 1-10.

Galmés J, Ribas-Carbó M, Medrano H, Flexas J (2011) Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the CO₂ concentration under water stress. *Journal of Experimental Botany*, **62(2)**: 653-665.

Galmés J, Arnajuelo I, Medrano H, Flexas J (2013) Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosynthesis research*, **117**: 73-90.

Galmés J, Ochogavía JM, Gago J, Roddán EM, Cifre J, Condesa MA (2012) Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, Cell and Environment*, **36(5)**: 920-935.

García-Plazaola JI, Becerril JM (1999) A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochemical Analysis*, **10**: 307-313.

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, **990**: 87-92.

Gibon Y, Larher F (1997) Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, **251**:153-157.

Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*, **16**:3304-3325.

Giménez C, Mitchell VJ, Lawlor DW (1992) Regulation of photosynthesis rate of two sun flower hybrids under water stress. *Plant Physiology*, **98**: 516-524.

Goh CH, Nam HG, Park YS (2003) Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of rd22 gene to light in abscisic acid-entrained *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal*, **36**: 240-255.

Gunasekera D, Berkowitz GA (1993) Use of transgenic plants with Rubisco antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress. *Plant Physiology*, **103**: 629-635.

Guicherd P, Peltier JP, Gout E, Biligny R, Marigo G (1997) Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees*, **11**: 155-161

Grace SC, Logan B (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **355**: 1499-1510.

Greenway H, Munns R (1980) Mechanism of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, **31**: 149-190.

Hacke UG, Sperry JS (2001) Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **4**: 97-115.

Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, **6**: 431-438.

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, **207**:604-611.

Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS (2000) Removal of feedback inhibition of Δ -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*, **122**: 1129-1136.

Hsiao TC (1973) Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, **24**: 519-570.

Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteille M, Stitt M, Gibon Y, Muller B (2010) Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology*, **154**: 357-372.

IPCC (2007). Summary for policymakers of climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press.

Ishizaki K, Schauer N, Larson TR, Graham IA, Fernie AR, Leaver C (2010) The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of *Arabidopsis* in extended darkness. *The Plant Journal*, **47(5)**: 751-760.

Iwasaki M, Paszkowski J (2014) Epigenetic memory in plants. *The EMBO journal*, **33(16)**: 1-12.

Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, **225**:165-167.

Kim JM, To TK, Nishioka T, Seki M (2010) Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant, Cell and Environment*, **33**: 604-611.

Kim JM, To TK, Ishida J, Matsui A, Kimura H, Seki M (2012) Transition of chromatin status during the process of recovery from drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **53**: 847-856.

Kocsy G, Laurie R, Szalai G, Szilágyi, Simon-Sarkadi V, Galiba G, DeRonde JA (2005) Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. *Physiologia Plantarum*, **124**: 227-235.

Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E, Dormann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D (2005) The Golm metabolome database. *Bioinformatics*, **21**: 1635-1638.

Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*, **79**: 209-218.

Larcher W (1983) *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin.

Laing WA, Ögren WL, Hageman RH (1974) Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂ and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Plant Physiology*, **54**: 678-685.

Lambers H, Chapin III FS, Pons TL (2008) *Plant Physiological Ecology*, 2nd (Ed).Springer, New York.

Le Rudulier D, Strom AR, Dandekar AM, Smith LT, Valentine RC (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science*, **224**: 1064-1068.

Lee DH, Lee CB (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber in gel enzyme activity assays. *Plant Science*, **159**: 75-85.

Lichtenthaler HK (1998) The stress concept in plants: an introduction. In: Csermely P, (ed), *Stress of Life: From Molecules to Man*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **851**: 187-98.

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, **148**: 350-382.

Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, **47**: 239-247.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, **1**: 387-396.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, **25**: 402-408.

Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J (2008) Tag Finder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*, **24**: 732-737.

Ma YH, Ma FW, Wang YH, Zhang JK (2011) The responses of the enzymes related with ascorbate-glutathione cycle during drought stress in apple leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**: 173-180.

Maeda H, Dudareva N (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **63**: 73-105.

Malatrasi M, Corradi M, Svensson JT, Close TJ, Gulli M, Marmioli N (2006) A branched-chain amino acid aminotransferase gene isolated from *Hordeum vulgare*s differentially regulated by drought stress. *Theoretical and Applied Genetics*, **113**: 965-976.

Maroco JP, Rodrigues ML, Lopes C, Chaves MM (2002) Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grape vine under drought - metabolic and modeling approaches. *Functional Plant Biology*, **29**: 451-459.

Marraccini P, Freire LP, Alves GSC, Pierre, Vieira NG, Ramos HJO, Montagnon C, Vieira LGE, Leroy T, Pot D, Silva VA, Rodrigues GC, Andrade AC (2011) RBCS1 expression in coffee: *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. *BMC Plant Biology*, **11**, 85.

Martins SCV, Galmés J, Molins A, DaMatta FM (2013) Improving the estimation of mesophyll conductance to CO₂: on the role of electron transport rate correction and respiration. *Journal of Experimental Botany*, **64(11)**: 3285-3298.

Maxwell D, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **96**: 8271-8276.

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, **51**: 659-668.

Medrano H, Parry MAJ, Socias X, Lawlor DW (1997) Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Annals of Applied Biology*, **131**: 491-501.

Müller JE, Whitsitt MS (1997) Plant cellular responses to water deficit. In: Belhassen E, (Ed.), *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 41-46.

Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, van Kleunen M (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*, **15**: 684-692.

Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology*, **164**: 1636-1648.

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, **147**: 1251-1263.

Niyogi KK (2000) Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 455-460.

Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer C (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, **35**: 454-484.

Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology*, **164**: 1636-1648.

Nolte KD, Hanson AD (1997) Proline accumulation and methylation to proline betaine in citrus: implications for genetic engineering of stress resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **122**(1): 8-13.

Novitskaya L, Trevanion SJ, Driscoll S, Foyer CH, Noctor G (2002) How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis. *Plant Cell and Environment*, **25**: 821–835.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant Journal*, **50**: 1093-1106.

Nunes-Nesi A, Araújo WL, Fernie AR (2011) Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, **155**: 101-107.

Padmasree K, Padmavathi L, Raghavendra AS (2002) Essentiality of mitochondrial oxidative metabolism for photosynthesis: optimization of carbon assimilation and protection against photoinhibition. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **37**: 71-119.

Patonnier MP, Peltier JP, Marigo G (1999) Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 1223-1229.

Parry MAJ, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany*, **89**: 833-839.

Passioura JB (1997) Drought and drought tolerance. In: Belhassen E, (Ed.), *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-6.

Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Ducatti C (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, **167**: 1307-1314.

Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Ducatti C (2005) Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany*, **96**: 101-108.

Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT (2006) 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*, **56**: 253-263.

Queval G, Noctor G (2007) A plate-reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione and ascorbate in tissue extracts. Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytical Biochemistry*, **363**: 58-69.

Sack L, Holbrook NM (2006) Leaf hydraulics. *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 361-381.

Salgado PR, Favarin JL, Leandro RL, Lima Filho OF (2008) Totalphenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. *Scientia Agricola*, **65**: 354-359.

Silva PEM, Cavatte PC, Morais LE, Medina EF, DaMatta FM (2013) The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* to the water supply? Implications for breeding aimed at improving drought tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, **87**: 49-57.

Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Ferreres F, Moreno DA (2012) Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique. *Food Chemistry*, **134**: 775-782.

Santiago LS, Goldstein G, Meinzer FC, Fisher JB, Machado K, Woodruff D, Jones T (2004) Leaf photosynthetic traits scale with hydraulic conductivity and wood density in Panamanian forest canopy trees. *Oecologia*, **140**: 543-550.

Servillo L, Giovane A, Balestrieri ML, Cautela D, Castaldo D (2011) Proline derivatives in fruits of bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poit): presence of N-methyl-L-proline and 4-hydroxy-L-prolinebetaine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59** (1): 274-281

Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP (2008) The *Arabidopsis* onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell*,**20**:2909-2925.

Sperry JS, Nichols KL, Sullivan JEM, Eastlack SE (1994) Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of Northern Utah and interior Alaska. *Ecology*, **75**: 1736-1752.

Sperry J (2000) Hydraulic constraints on plant gas exchange. *Agricultural and Forest Meteorology*, **104**: 13-23.

Sperry JS, Meinzer FC, McCulloh KA (2008) Safety and efficiency conflicts in hydraulic architecture: scaling from tissues to trees. *Plant, Cell and Environment*, **31**: 632-645.

Silvente S, Sobolev AP, Lara M (2012) Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. *Plos One*, **119** (3): 355:364.

Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, SAEG (1993) versão 5.0, Fundação Arthur Bernardes, Viçosa.

Sokol A, Kwiatkowska A, Jerzmanowski A, Prymakowska-Bosak M (2007) Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and *Arabidopsis* cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta*, **227**: 245-254.

Schauer N, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner U, Forbes MG, Willmitzer L, Fernie AR, Kopka J (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters*, **579**: 1332-1337.

Scheffer M, Carpenter S, Foley JA, Folke C, Walker B (2001) Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature*, **413**: 591–596.

Stieger PA, Feller U (1994) Senescence and protein remobilization in leaves of maturing wheat plants grown on waterlogged soil. *Plant and Soil*, **166**: 173–179.

Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkampa S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Korff MV, Steinhauser MC, Keurentjes JJB, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Thomas Altmann, Stitt M (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**: 10348-10353.

Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G (2012) ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, **35**: 259-270.

Shaner DL, Boyer JS (1976) Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiology*, **58**: 499-504.

Shvaleva A, Silva FC, Scotti P, Oufir M, Hausman JF, Cedric G, Ramos P, M. Almeida MH, Rodrigues ML, Pereira JS, Chaves MM (2008) Physiological and biochemical responses to low non-freezing temperature of two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought resistance. *Annals of Forest Science*, **65**: 1-10.

Szabados L, Savoure A (2011) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, **15** (2): 89-97.

Sharma S, Villamor JG, Verslues PE (2011) Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology*, **157**: 292-304.

Ta TC, Joy KW (1986) Metabolism of some amino acids in relation to the photorespiratory nitrogen cycle of pea leaves. *Planta*, **169**: 117–122.

Tardieu F (2005) Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geoscience*, **337**: 57-67.

Tezara W, Mitchell WJ, Driscoll SD, Lawlor DW (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, **401**: 914-917.

To TK, Nakaminami K, Kim JM, Morosawa T, Ishida J, Tanaka M (2011) *Arabidopsis* HDA6 is required for freezing tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **406**: 414-419.

van Volkenburgh E (1999) Leaf expansion an integrating plant behavior. *Plant, Cell and Environment*, **22**: 1463-1473

Verhoeven KJF, Jansen JJ, vanDijk PJ, Biere A (2010) Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist*, **185**: 1108-1118.

Waltera J, Nagyb L, Heinb R, Rascherc U, Beierkuhnleinb C, Willnerd E, Jentsche A (2011) Do plants remember drought? *Environmental and Experimental Botany*, **71**: 34-40.

Williamson JD, Jennings DB, Guo WW, Pharr MP (2002) Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols multifunctional plant protection? *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127(4)**: 467–473.

Wingler A, Quick WP, Bungard RA, Bailey KJ, Lea PJ, Leegood RC (1999) The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant, Cell and Environment*, **22**: 361–373.

Yildiz-Aktas Y, Dagnon S, Gurel A, Gesheva E, Edreva A (2009) *Journal of Agronomy and Crop Science*, **195**: 247-253.

Yin X, Struik PC, Romero P, Harbinson J, Evers JB, van der Putten PEL, Vos J (2009) Using combined measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence to

estimate parameters of a biochemical C3 photosynthesis model: a critical appraisal and a new integrated approach applied to leaves in a wheat (*Triticum aestivum*) canopy. *Plant, Cell and Environment*, **32**: 448-464.

Younis HM, Boyer JS (1979) Conformation and activity of chloroplast coupling factor exposed to low chemical potential of water in cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **548**: 328-340.