

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

MADLLES QUEIROZ MARTINS

**DESENVOLVIMENTO, PRODUTIVIDADE E GENES DE
REFERÊNCIA DE GENÓTIPOS DE *COFFEA* SPP. SOB
TEMPERATURAS ADVERSAS**

**ALEGRE - ES
2017**

MADLLES QUEIROZ MARTINS

**DESENVOLVIMENTO, PRODUTIVIDADE E GENES DE
REFERÊNCIA DE GENÓTIPOS DE *COFFEA* SPP. SOB
TEMPERATURAS ADVERSAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Partelli

**ALEGRE - ES
2017**

MADLLES QUEIROZ MARTINS

**DESENVOLVIMENTO, PRODUTIVIDADE E GENES DE
REFERÊNCIA DE GENÓTIPOS DE COFFEA SPP. SOB
TEMPERATURAS ADVERSAS**

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

Aprovada em 20 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA



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



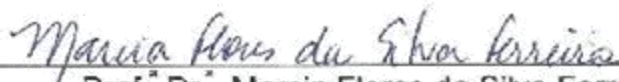
Prof. Dr. Adésio Ferreira - (Coorientador)
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador



Prof. Dr. Henrique Duarte Vieira
Universidade Estadual do Norte Fluminense



Prof. Dr. José Cochicho Ramalho - (Coorientador)
Universidade de Lisboa



Prof. Dr. Marcia Flores da Silva Ferreira

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Martins, Madlles Queiroz, 1984-

M382d Desenvolvimento, produtividade e genes de referência de genótipos de Coffea spp. sob temperaturas adversas / Madlles Queiroz Martins. – 2017.

143 f. : il.

Orientador: Fábio Luiz Partelli.

Coorientadores: Adésio Ferreira; José Domingos Cochicho Ramalho.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Plantas – Melhoramento genético. 2. Café. 3. Fisiologia. 4. Aquecimento global. 5. Expressão gênica. 6. Tolerância. I. Partelli, Fábio Luiz. II. Ferreira, Adésio. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 631.523

*Mas o fruto do Espírito é amor, alegria,
paz, paciência, amabilidade, bondade,
fidelidade, mansidão e domínio próprio.*

Contra essas coisas não há lei.

Gálatas 5. 22-23

A minha esposa Hêmily;

A meu filho Francisco;

A meu sobrinho Eduardo

A minha Irmã Mabllah e cunhado Eduardo

A todos meus amigos;

A meus avós maternos Francisco e “Laurinda” *em memória*

A meus avós paternos “Sebastião” *em memória* e Inês

OFEREÇO

Aos meus pais, Wetzal e Neide,
por amar, dedicar e educar;

Aos meus sogros, José e Rosângela,
por confiar e apoiar

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver e concluir este trabalho.

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

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela concessão de bolsa de estudos, em nível de doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

Ao CNPq por disponibilizar recursos para implantação da lavoura experimental.

Ao Prof. Dr. Adelmo Golinski pela administração da lavoura experimental no IFGoiano.

Ao Prof. Dr. Fábio Luiz Partelli, pela orientação e total apoio.

Ao Instituto de Investigação Científica Tropical, I.P. (IICT), LEAF (UID/AGR/04129/2013), Instituto Superior de Agronomia (ISA), da Universidade de Lisboa, e GeoBioTec (UID/GEO/04035/2013), Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade NOVA de Lisboa, todos de Portugal, no âmbito dos quais decorreram os estágios, orientações e aprendizados socioculturais.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal, através do projecto PTDC/AGR-PRO/3386/2012, no âmbito do qual decorreram os trabalhos desenvolvidos em Portugal.

Ao Prof. Dr. José Cochicho Ramalho (IICT e ISA), bolsistas e aos funcionários dos laboratórios do IICT e ISA, pela amizade e total apoio na condução e avaliação de experimentos.

Ao Prof. Dr. Fernando José Cebola Lidon, pelas aulas teóricas e práticas durante a fase de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

À Prof.^a Dr.^a. Ana Isabel Ribeiro Barros, por disponibilizar equipamentos laboratoriais relacionados ao estudo de expressão de genes e pelos ensinamentos.

À família de Norberto e Paula Alves, pelo enorme suporte em minha estadia em Oeiras, Portugal.

À Isabel P. Pais, pelo total apoio e ensinamentos em análises laboratoriais durante o Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

À Prof.^a Dr.^a. Paula Scotti Campos pelos ensinamentos em bioquímica (lipídeos) durante o Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

Ao Instituto Federal Goiano (IFGOIANO), pela disponibilização de espaço no campo, insumos, laboratórios e mão de obra, necessários ao bom andamento dos experimentos em nível de campo.

Ao funcionário do INCAPER, Aldo Luiz Mauri, pela disponibilização de mudas de *Coffea canephora*.

Ao bolsista Nivaldo de Souza Pimentel, pelo apoio total na implantação, condução, coleta de dados e conclusão experimental, realizados no IFGOIANO.

A minha esposa, Hêmily Zacché Pereira, pela dedicação e companheirismo.

Aos amigos, Ana Sofia Correia Fortunato, Filipe Colwell de Jesus, Mário João Amaro da Costa, Nuno Miguel Henriques Duro, Tiago de Souza Marçal, Weverton Pereira Rodrigues, pelas ajudas inestimáveis e companheirismo durante o curso de doutorado.

BIOGRAFIA

Madlles Queiroz Martins, nascido no município de Ibatiba, Estado do Espírito Santo, em 23 de abril de 1984, primeiro de dois filhos da família de Wetzel Magalhães Martins e Neide Rosa Queiroz Martins. Coursou os estudos fundamentais nas escolas David Gomes e Professora Maria Trindade de Oliveira, onde concluiu o ensino médio. Em 2003, ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo, na cidade de Alegre, com o propósito de se tornar Engenheiro Agrônomo, o que foi concluído em 2009. Em 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, área de concentração em Fitotecnia, o que foi concluído em 2011. Em 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento, área de concentração Melhoramento de Plantas.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Introdução geral | 16 |
| Referências | 19 |
| Capítulo 1 | 22 |
| Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in Coffea spp. | 22 |
| Abstract | 22 |
| Keywords | 22 |
| Abbreviations | 22 |
| 1. Introduction | 23 |
| 2. Materials and methods | 26 |
| 2.1 Plant material and experimental conditions | 26 |
| 2.2 PSII photoinhibition status | 26 |
| 2.3 Photosynthetic pigment characterization | 27 |
| 2.4 Maximal activities of antioxidant enzymes | 27 |
| 2.5 Quantification of non-enzymatic antioxidants | 28 |
| 2.6 HSP70 quantification | 28 |
| 2.7 Raffinose family oligosaccharides quantification | 29 |
| 2.8 Expression studies of selected genes | 29 |
| 2.9 Statistical analysis | 31 |
| 3. Results | 31 |
| 3.1 PSII photoinhibition | 31 |
| 3.2 Photosynthetic pigment | 33 |
| 3.3 Antioxidant enzyme activities | 37 |
| 3.4 Other protective molecules | 39 |
| 3.5 Expression of genes with a potential role in heat acclimation | 41 |
| 4. Discussion | 43 |
| 4.1 PSII photoinhibition in face of high CO ₂ and temperature | 43 |
| 4.2 Triggering heat-protective mechanisms under enhanced [CO ₂] | 44 |
| 5. Conclusions | 51 |
| Funding | 53 |
| Acknowledgements | 53 |
| Conflict of Interest Statement | 53 |
| Author Contributions | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 6. References | 54 |
| Capítulo 2 | 60 |
| Selection and validation of reference genes for accurate qRT-PCR data normalization in <i>Coffea</i> spp. under a climate changes context of interacting high air [CO₂] and temperature | 60 |
| Abstract | 60 |
| Keywords | 60 |
| Abbreviations | 60 |
| Funding | 60 |
| 1. Introduction | 61 |
| 2. Materials and Methods | 63 |
| 2.1 Plant material and growth conditions | 63 |
| 2.2 Total RNA isolation and cDNA synthesis..... | 64 |
| 2.3 Selection of Reference Gene Sequences and Primer Design | 66 |
| 2.4 Quantitative real-time polymerase chain reaction conditions | 66 |
| 2.5 Calculation of PCR Efficiencies | 67 |
| 2.6 Selection of reference genes | 67 |
| 2.7 Determination of the minimum number of reference genes for data normalization | 67 |
| 2.8 Validation of reference gene analysis | 68 |
| 3. Results and Discussion | 68 |
| 4. Conclusions | 78 |
| Acknowledgements | 78 |
| 5. References | 79 |
| Capítulo 3 | 84 |
| Crescimento vegetativo de 28 genótipos de <i>Coffea canephora</i> cultivados a 750 metros de altitude | 84 |
| Resumo | 84 |
| Abstract..... | 84 |
| 1. Introdução | 85 |
| 2. Materiais e métodos | 87 |
| 3. Resultados e discussão | 89 |
| 4. Conclusões | 97 |
| 5. Agradecimentos | 98 |
| 6. Referências..... | 99 |

| | |
|---|-----|
| Capítulo 4 | 103 |
| Nutrientes em folhas de genótipos de <i>Coffea canephora</i> cultivados a 750 metros de altitude | 103 |
| Resumo | 103 |
| Abstract..... | 103 |
| 1. Introdução | 104 |
| 2. Materiais e métodos | 105 |
| 3. Resultados e discussão | 108 |
| 4. Conclusões | 120 |
| 5. Agradecimentos | 120 |
| 6. Referências..... | 121 |
| Capítulo 5 | 125 |
| Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de <i>Coffea canephora</i> cultivados em altitude elevada | 125 |
| Resumo | 125 |
| Abstract..... | 125 |
| 1. Introdução | 126 |
| 2. Material e métodos | 127 |
| 3. Resultados e discussão | 131 |
| 4. Conclusões | 138 |
| 5. Agradecimentos | 138 |
| 6. Referências..... | 139 |
| Conclusões Finais..... | 142 |

RESUMO

O aquecimento global pode promover mudanças no zoneamento agroclimatológico do cafeeiro, e consequentemente no cenário mundial da cafeicultura. O objetivo geral deste trabalho foi de avaliar o desenvolvimento, produtividade e genes de referência de genótipos de *Coffea* spp. Sob temperaturas adversas. O trabalho foi dividido em 5 capítulos: **Capítulos 1 e 2:** O aumento do nível de CO₂ atmosférico e as elevadas temperaturas, podem promover alterações nas plantas. Neste caso os objetivos deste estudo foram: ocorrência de fotoinibição (PSII), seguida de uma caracterização dos mecanismos de proteção da planta, incluindo a dinâmica de pigmentos fotossintéticos, sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, a quantificação da família rafinose Oligossacarídeos (RFOs), quantificação de proteína de choque térmico, o estudo detalhado de genes de referência para normalização em análise de expressão de genes selecionados com papéis potenciais na aclimação por calor. O experimento foi realizado adotando-se o arranjo experimental do tipo fatorial simples, com delineamento inteiramente casualizado, sendo empregado dois fatores, compostos por dois níveis de CO₂ e outro com quatro níveis de temperatura. Foram utilizados dois genótipos de *Coffea arabica* (cv. Icatu e IPR 108) e um *Coffea canephora* (cv. Conilon clone 153), cultivadas em vasos de 80 L. O experimento foi realizado em duas câmaras de crescimento, com condições de clima controlado. A primeira câmara foi mantida a 380 ppm de CO₂ e a segunda câmara a 700 ppm de CO₂. A temperatura foi então gradualmente aumentada de 25/20°C para 42/34°C em ambas as câmaras de crescimento a uma taxa de 0,5°C dia⁻¹, com 7 dias de estabilização a 31/25, 37/30 e 42/34°C para avaliações. As duas câmaras de crescimento foram mantidas com umidade relativa de 75%, radiação fotossinteticamente ativa de ca. 750-800 micromol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12 h, de forma estável. Foi observada tolerância de calor relevante até 37/30°C para ambos [CO₂] (380 ppm e 700 ppm), em todos os genótipos. Essa tolerância foi alcançada com o suporte de várias moléculas protetoras (neoxantina, luteína, carotenos, TOC, HSP70, rafinose), alterações das atividades de enzimas antioxidantes (SOD, APX, QR, CAT) e pela expressão sobre-expressão de alguns genes (ELIP e Chape 20). À 42/34°C a fotoinibição foi manifestada, especialmente nas plantas cultivadas a 380 ppm e no genótipo Icatu. Observou-se sobre-expressão no genótipo cv. Conilon clone 153 à temperatura mais elevada, de acordo com a sua melhor tolerância a temperaturas elevadas. TOC e HSP70 foram particularmente relevantes em genótipos de *C. arabica*. No geral, os resultados obtidos mostraram que o alto [CO₂] atenuou o impacto do calor por meio de maior funcionamento fotossintético, sobre-regulação de moléculas protetoras, bem como pela maior atividade de algumas enzimas antioxidantes. Referente ao estudo de genes de referência, o ranking final obtido com RefFinder classificou o MDH como o gene mais estável para utilização e normalização para análise de expressão de genes, independente do estresse avaliado neste estudo. **Capítulos 3, 4 e 5:** Levando em consideração o aumento de temperatura previsto pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), pode-se imaginar que algumas áreas agrícolas produtoras de *C. arabica* poderão se tornar inaptas. Neste sentido plantas de *C. canephora* possivelmente poderão ocupar essas áreas, por serem plantas que se adaptam melhor a condições estressantes promovidas pelo calor e temperaturas frias positivas. Neste contexto vê-se a necessidade de experimentar genótipos de *C. canephora* em

regiões as quais possuem o risco de mudança de zoneamento agrícola do *C. arabica* para *C. canephora*, como é o caso deste estudo. Os objetivos destes estudos foram de: (a) avaliar a capacidade produtiva de 28 diferentes genótipos de *Coffea canephora* desenvolvidos no clima de altitude elevada. (b) Caracterizar a taxa de crescimento de genótipos de *Coffea canephora* cultivados em altitude elevada. (c) Identificar genótipos com potencial para ser cultivado na região sul do cerrado de Goiás. O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano Campus Morrinhos, Goiás. Utilizando-se 28 genótipos de *C. canephora*, multiplicados por clones e sementes. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco plantas. Foram avaliadas as características: Produtividade em sacas/ha em quatro safras, taxa de crescimento e quantificação de nutrientes acumulados nas folhas coletadas no inverno e verão. Os resultados obtidos para o cultivo de *C. canephora* em altitude revelam variabilidade genética entre os genótipos, condição que favorece a obtenção de ganhos com a seleção clonal, também foi observado elevada herdabilidade, resultado que indica a alta precisão quanto a seleção de genótipos superiores. Os genótipos de *C. canephora* que se destacaram em produtividade, estabilidade e adaptabilidade foram: os genótipo 3V da variedade "Vitória"; NV2; NV8; P1; VERDIM TA e A1, deve-se considerar que dentre esses seis genótipos considerados superiores existem diferentes graus de similaridade o que depende da característica em questão. As taxas de crescimento de ramos plagiotrópicos e ortotrópicos dos materiais genéticos de *C. canephora* foram afetados negativamente durante período em que as temperaturas mínimas foram abaixo de 17°C. Para a maioria dos nutrientes observa-se maiores valores médias em folhas coletadas no inverno. A análise de componentes principais indica que os grupos de genótipos de *C. canephora* alteram as relações entre objetos (genótipos) e descritores (teor de nutrientes) de acordo com e época de coletadas das folhas (inverno e Verão).

ABSTRACT

Global warming may promote changes in Agroclimatic zoning of the coffee, and consequentemente in the global coffee scene. The general objective of this work was to evaluate the development, productivity and reference genes of *Coffea* spp genotypes. Under adverse temperatures. The work was divided in 5 chapters: **Chapters 1 and 2:** Increasing the atmospheric CO₂ level and the high temperatures, can promote changes in the plants. This fact is of concern to mankind as regards the maintenance of food production, especially the world coffee industry. In this case the objectives of this study were: the occurrence of PSII photoinhibition (as photodegradation marker), followed by a characterization of the protection mechanisms, including the dynamics of photosynthetic pigments, enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems, and the quantification of the raffinose family Oligosaccharides (RFOs) and heat shock protein, in addition, detailed study of reference genes to evaluate the expression of selected genes with potential roles in heat acclimatization. The experiment was carried out using a simple factorial arrangement, in a completely randomized design, using two factors, the first one was composed of two levels of CO₂ and the second factor was composed of four temperature levels. For the experimentation, two *C. arabica* genotypes (cv. Icatu and IPR 108) and one *C. canephora* (cv. Conilon clone 153) were grown in 80 L pots. The experiment was carried out in two growth chambers (Model 10000 EHHF, Mark Aralab, Portugal), with controlled climate conditions. The first chamber was controlled to maintain at constant 380 ppm of CO₂ and the second chamber at 700 ppm of CO₂. In these chambers the temperature was gradually increased every 30 days, taken day / night: 25/20°C; 31/25°C; 37/30°C at 40/34°C. The two growth chambers were submitted to 75% relative humidity, photosynthetically active radiation of ca. 750-800 micromol m⁻² s⁻¹ and photoperiod of 12 h, continuously throughout the experiment. According to results obtained in this study, relevant heat tolerance was observed up to 37/30°C for both [CO₂], considering all the genotypes evaluated in this study. This tolerance was achieved with support of several protective molecules (neoxanthin, lutein, carotenes, TOC, HSP70, raffinose), changes in antioxidant enzyme activities (SOD, APX, QR, CAT) and upregulated expression of some genes (ELIP, Chape 20). At 42/34°C the photoinhibition was manifested, especially in plants cultivated the 380 ppm and in the Icatu genotype. At this temperature an overall reinforcement of the antioxidative system was not observed, however, there was a positive regulation of protection mechanisms (HSP70, chaperonins, ELIP and APX Cyt) as well as raffinose content, which together constituted a common line for all genotypes evaluated in this study. A consistently higher expression in CL153 was observed at the highest temperature, according to its better tolerance at elevated temperatures. TOC and HSP70 appeared to be particularly relevant in *C. arabica* genotypes. The presence of RFOs, lutein, β-carotene, TOC and HSP70, as well as upregulated expression of protective protein-related genes (ELIPS, HSP70, Chape 20 and 60) and antioxidant enzymes (CAT, CuSOD2, APX Cyt, APX Chl), Probably acted together to control the formation and elimination of ROS, induced by the increase in temperature. Overall, the results showed that the high [CO₂] attenuated the impact of heat through higher photosynthetic performance, upregulation of protective molecules, as well as higher activity of some antioxidant enzymes. The expression stability varied according to the type of stress for most genes. The final ranking obtained with RefFinder ranked MDH as the most stable gene for a

global use, regardless of the assessed stress. **Chapters 3, 4 and 5:** Taking into account the temperature rise predicted by the IPCC, one can imagine that some agricultural areas producing *Coffea arabica* may become unsuitable for cultivation. In this sense, plants of *Coffea canephora* may possibly occupy these areas, since they are plants that better adapt to the stressful conditions promoted by heat and possibly positive cold temperatures. In this context, it is necessary to experiment with *Coffea canephora* genotypes in regions that have the risk of shifting agricultural zoning from *Coffea arabica* to *Coffea canephora*, as is the case in this study. (a) To evaluate the productive capacity of 28 different genotypes of *Coffea canephora* grown in high altitude climate. (b) Characterize the growth rate of *Coffea canephora* genotypes grown at high altitude. (c) To identify genotypes with potential to be cultivated in the southern region of the cerrado of Goiás. The experiment was carried out at the Federal Institute of Education, Science and Technology Goiano Campus Morrinhos, Goiás. Using 28 genotypes of *Coffea canephora*, multiplied by clones and Seeds. The design was a randomized block design, with four replications, each replicate being composed of five plants. The following characteristics were evaluated: productivity/ ha of the 28 genotypes of *Coffea canephora* in 4 seasons, growth rate and quantification of accumulated nutrients in leaves collected in winter and summer. The results showed a significant genetic variability among the genotypes evaluated in this study, a condition that favors the gain of clonal selection. In addition, a high heritability was observed among the genotypes, a result that indicates the high precision regarding the selection of superior genotypes. The genotypes that stood out in terms of productivity stability and adaptability were: the 3V genotype of the "Vitória" variety; NV2; NV8; P1; VERDIM TA and A1, It should be considered that of the six genotypes considered superior there are different degrees of similarity depending on the characteristic in question. The growth rates of plagiotropic and orthotropic branches of the *C. canephora* genetic material were negatively affected during a period when the minimum temperatures were below 17°C. For most of the nutrients, it is observed higher average values in leaves collected in the winter. Principal components analysis indicates that the genotype groups of *C. canephora* alter the relationships between objects (genotypes) and descriptors (nutrient content) according to the season of leaves collected (winter and summer).

Introdução geral

Temas relacionados ao impacto das alterações climáticas globais têm se consolidado com elevada importância, sendo que informações importantes sobre seus efeitos sobre as plantas são apresentados permanentemente publicados nos diversos meios de comunicação científica. Essa abordagem deve-se às possíveis consequências das alterações climáticas no metabolismo das plantas, podendo promover efeitos no seu zoneamento de cultivo, crescimento, produtividade e conseqüentemente na alteração da qualidade dos produtos agrícolas.

As Previsões dos modelos do Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC, indicam numa condição extrema, o aumento da concentração de CO₂ atmosférico entre 800 e 1150 $\mu\text{L L}^{-1}$, e aumento médio de temperatura entre 3,7 a 4,8°C até o ano de 2100 (IPCC, 2014). Essas alterações podem promover efeitos negativos aos vegetais, tendo em vista que temperaturas elevadas modificam uso da energia solar, alterando tanto a difusão do gás no mesófilo foliar (Lambers et al., 2008) quanto a composição e conteúdo do pigmento fotossintético (Haldimann e Feller, 2004), afetam as relações hídricas e a demanda por evaporação, a fluidez e a estabilidade dos sistemas de membrana, bem como hormônios e metabólitos primários e secundários (Wahid et al., 2007).

Coletivamente, essas alterações podem interromper a homeostase celular e prejudicar a fotossíntese e outros processos fisiológicos importantes (Long et al., 2006; Suzuki e Mittler, 2006; Kirschbaum, 2011). Os efeitos nocivos do estresse térmico estão freqüentemente ligados ao acúmulo de espécies de oxigênio reativo (ROS) (Suzuki e Mittler, 2006; Hasanuzzaman et al., 2013).

O controle da ROS pode se alcançado pelo aumento dos mecanismos de dissipação de energia (por exemplo, fotorespiração, transporte de elétrons pseudocíclicos e síntese de pigmentos fotoprotetores) (Logan, 2005; Batista Santos et al., 2011), ou diretamente, agindo sobre a sua produção/limpeza, utilizando a sobreexpressão complementar de enzimas (por exemplo, SOD, APX, GR), bem como a ação de antioxidantes hidrofílicos (ascorbato e

glutaciona) e lipofílicos (eg zeaxantina, β -caroteno e α -tocoferol) (Foyer, 2002; Logan, 2005; Munné-Bosch, 2005; Smirnoff, 2005).

Em regiões tropicais, onde ocorrem normalmente maior incidência de carga de radiação, aumentando a intensidade e frequência de ondas de calor, as espécies se tornam mais vulneráveis quanto ao estresse ocasionado pelas temperaturas elevadas (Corlett, 2011). O café é uma das importantes culturas agrícolas cultivadas nos trópicos. Mais de 9 bilhões de quilos de café são consumidos anualmente em todo o mundo (ICO, 2017).

A temperatura média anual ideal é uma das diferenças bem conhecidas entre *C. arabica* (18-23°C) e *C. canephora* (22-26°C) (DaMATTA e Ramalho, 2006). O aumento na frequência e intensidade de ondas de calor nos trópicos pode ameaçar o habitat adequado para o cultivo de *Coffea* spp. (Bunn et al., 2014; Camargo, 2010; Craparo et al., 2015, DaMATTA e Ramalho, 2006, Davis, Gole, Baena, & Moat, 2012).

A elevação de CO₂ na atmosfera pode afetar processos vegetais fundamentais, como a fotossíntese e a respiração (Woodward, 2002; Ainsworth e Rogers, 2007; Kirschbaum, 2011), alterando em última análise o crescimento, o rendimento e a qualidade da cultura (Luo et al., 1999; DaMATTA et al., 2010), atuando para mitigar os efeitos negativos das temperaturas elevadas (Rodrigues et al., 2016; Martins et al., 2016). E neste caso eleva-se a importância de quantificar as respostas fisiológicas e a capacidade de recuperação de plantas de *Coffea* spp. Cultivadas sob condição de estresse por calor em interação com CO₂ elevado (Martins et al., 2014, Martins et al., 2016).

Deve-se considerar ainda que, caso ocorra aquecimento médio global entre 1 e 3°C, determinadas áreas favoráveis ao cultivo de *C. arabica* deixariam de ser apropriadas (Assad et al., 2004). Sendo assim variedades de *C. canephora* poderão ocupar essas áreas, considerando que são mais tolerantes a alta temperatura e possivelmente a baixas temperaturas positivas.

Plantas de *C. canephora* quando cultivadas em baixas temperaturas, sofrem alterações nos processos fotossintéticos, e neste caso apresentam redução da condutância estomática, diminuição na taxa de fotossíntese líquida e menor eficiência fotossistema II (Zhu et al., 2008; Partelli et al., 2009). No entanto, *C. canephora* possui mecanismos de defesa que podem permitir-lhes capacidades diferenciadas de aclimatação, o que depende da cultivar (Ramalho et al., 2014).

Diante do contexto o objetivo deste estudo foi estudar aspectos que revelam os efeitos de alto CO₂ atmosférico e temperatura elevada e outra linha de pesquisa que considere obter informações sobre a caracterização de genótipos de *C. canephora* cultivados em elevada altitude, onde normalmente cultiva-se *C. arabica*.

Referências

- AINSWORTH, E.A.; ROGERS, A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell Environ.* 30, 258-270, 2007.
- ASSAD, E.D.; PINTO, H.S.; ZULLO JUNIOR, J.; ÁVILA, A.M.H. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 39(11), 1057-1064, 2004.
- BATISTA-SANTOS, P.; LIDON, F.C.; FORTUNATO, A.; LEITÃO, A.E.; LOPES, E.; PARTELLI, F.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. – Photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. *J. Plant Physiol.* 168, 792-806, 2011.
- BUNN, C.; LÄDERACH, P.; RIVERA, O.O.; KIRSCHKE, D. A bitter cup: Climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Clim. Change.* 129, 89-101, 2014.
- CAMARGO, M.B.P. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. *Bragantia* 69(1), 239-247, 2010.
- CRAPARO, A.C.W.; VAN ASTEN, P.J.A.; LÄDERACH, P.; JASSOGNE, L.T.P.; GRAB, S.W. *Coffea arabica* yields decline in Tanzania due to climate change: Global implications. *Agric. For. Meteo.* 207, 1-10, 2015.
- CORLETT, R.T. Impacts of warming on tropical lowland rainforests. *Trends Ecol. Evol.* 26, 606-613, 2011.
- DAMATTA, F.M., GRANDIS, A., ARENQUE, B.C., AND BUCKERIDGE, M.S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Res. Int.* 43, 1814-1823, 2010.
- DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 55-81, 2006.
- DAVIS, A.P.; GOLE, T.W.; BAENA, S.; MOAT, J. The impact of climate change on indigenous arabica coffee (*Coffea arabica*): Predicting future trends and identifying priorities. *PLoS ONE.* 7, e47981, 2012.
- FOYER, C.H. “The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants”, in *Oxidative stress in plants*, ed. D. Inzé and M. Van Montagu (London, Taylor & Francis), 33-68, 2002.
- HALDIMANN, P.; FELLER, U. Inhibition of photosynthesis by high temperature in oak (*Quercus pubescens* L.) leaves grown under natural conditions closely correlates with a reversible heat-Udependent reduction of the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Cell Environ.* 27, 1169-1183, 2004.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: Kourosh Vahdati D., ed. *Abiotic stress - plant responses and applications in agriculture*. InTech, 169-205, 2013.
- ICO (International Coffee Organization). Trade statistics. Disponível em: <http://www.ico.org/prices/m1.htm>. Acesso em 23 de janeiro de 2017.
- IPCC. Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, ed. O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel, J.C. Minx

(Cambridge, Cambridge University Press, UK and New York, USA), p.1435. ISBN 978-1-107-65481-5.

KIRSCHBAUM, M.U.F. Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies. *Plant Physiol.* 155, 117-124, 2011.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F.S.; PONS, J.L. *Plant Physiological Ecology*, 2nd ed.. Springer-Verlag, New York, 2008.

LOGAN, B.A. "Reactive oxygen species and photosynthesis", in *Antioxidants and reactive oxygen in plants*, ed. N. Smirnoff (Oxford, Blackwell Publishing), 250-267, 2005.

LONG, S.P.; AINSWORTH, E.A.; LEAKEY, A.D.B.; NÖSBERGER, J.; ORT, D.R. Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science.* 312, 1918-1921, 2006.

LUO, Y.; REYNOLDS, J.; WANG, Y.; WOLFE, D.A. search for predictive understanding of plant responses to elevated [CO₂]. *Global Change Biol.* 5, 143-156, 1999.

MARTINS, L.D.; TOMAZ, M.A.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. *Clim. Change.* 126, 365-379, 2014.

MARTINS, M.Q.; RODRIGUES, W.P.; FORTUNATO, A.S.; LEITÃO, A.E.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SILVA, M.J.; REBOREDO, F.H.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I., LIDON, F.J.C., DAMATTA, F.M., RAMALHO, J.C. Protective Response Mechanisms to Heat Stress in Interaction with High [CO₂] Conditions in *Coffea* spp. *Front. Plant Sci.* 7:947, 2016.

MUNNÉ-BOSCH, S. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162, 743-748, 2005.

PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; VIANA, A.P.; BATISTA-SANTOS, P.; RODRIGUES, A.P.D.; LEITÃO, A.E.; RAMALHO, J.C. Low temperature impact on photosynthetic parameters of coffee genotypes. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 44(11), 1404-1415, 2009.

RAMALHO, J.C.; DaMATTA, F.M.; RODRIGUES, A.P.; SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.; BATISTA-SANTOS, P.; PARTELLI, F.L.; RIBEIRO, A.; LIDON, F.C.; LEITÃO, A.E. Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theor. Exp. Plant Physiol.*, 26(1), 5-18, 2014.

RAMALHO, J.C., RODRIGUES, A.P., SEMEDO, J.N., PAIS, I.P., MARTINS, L.D., SIMÕES-COSTA, M.C., LEITÃO, A.E., FORTUNATO, A.S., BATISTA-SANTOS, P., PALOS, I.M., TOMAZ, M.A., SCOTTI-CAMPOS, P., LIDON, F.C., AND DAMATTA F.M. (2013b). Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. *PLoS ONE.* 8(12), e82712.

RODRIGUES, W.P.; MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.S.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; SIMÕES-COSTA, M.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; COLWELL, F.; GOULAO, L.; MÁGUAS, C.; MAIA, R.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Global Change Biol.* 22(1), 415-431, 2016.

SMIRNOFF, N. "Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions", in *Antioxidants and reactive oxygen in plants*, ed. N.

Smirnoff (Oxford, Blackwell Publishing), 1-24, 2005.

SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* 126, 45-51, 2006.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199-223, 2007.

WOODWARD, F.I. Potential impacts of global elevated CO₂ concentrations on plants. *Cur. Op. Plant Biol.* 5, 207-211, 2002.

ZHU, S. Q.; ZHAO, H.; LIANG, J.S.; JI, B.H.; JIAO, D.M. relationships between phosphatidylglycerol molecular species of thylakoid membrane lipids and sensitivities to chilling-induced photoinhibition in rice. *J. Integrat. Plant Biol.*, 50, 194-202, 2008.

Capítulo 1

Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *Coffea* spp.

Abstract - Modelling studies have predicted that coffee crop will be endangered by future global warming, but recent reports highlighted that high [CO₂] can mitigate heat impacts on coffee. This work aimed at identifying heat protective mechanisms promoted by CO₂ in *Coffea arabica* (cv. Icatu and IPR108) and *C. canephora* cv. Conilon CL153. Plants were grown at 25/20°C (day/night), under 380 or 700 µL CO₂ L⁻¹, and then gradually submitted to 31/25, 37/30 and 42/34°C. Relevant heat tolerance up to 37/30°C for both [CO₂] and all coffee genotypes was observed, likely supported by the maintenance or increase of the pools of several protective molecules (neoxanthin, lutein, carotenes, α-tocopherol, HSP70, raffinose), activities of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), catalase (CAT), and the upregulated expression of some genes (*ELIP*, *Chaperonin 20*). However, at 42/34°C a tolerance threshold was reached, mostly in the 380-plants and Icatu. Adjustments in raffinose, lutein, β-carotene, α-tocopherol and HSP70 pools, and the upregulated expression of genes related to protective (*ELIPS*, *HSP70*, *Chape 20* and *60*) and antioxidant (*CAT*, *CuSOD2*, *APX Cyt*, *APX Chl*) proteins were largely driven by temperature. However, enhanced [CO₂] maintained higher activities of GR (Icatu) and CAT (Icatu and IPR108), kept (or even increased) the Cu,Zn-SOD, APX and CAT activities, and promoted a greater upregulation of those enzyme genes, as well as those related to HSP70, ELIPs, Chaperonins in CL153 and Icatu.. These changes likely favoured the maintenance of reactive oxygen species at controlled levels and contributed to mitigate of photosystem II photoinhibition at the highest temperature. Overall, our results highlighted the important role of enhanced [CO₂] on the coffee crop acclimation and sustainability under predicted future global warming scenarios.

Keywords - acclimation, antioxidants, coffee, chloroplast, climate change, enhanced [CO₂], global warming, heat.

Abbreviations - A - antheraxanthin; APX – ascorbate peroxidase; ASC – ascorbate; Chl - chlorophyll; ³Chl*, triplet state of Chl; Chl (a+b) – Total Chl; Cu,Zn-SOD -superoxide dismutase; DHAR – dehydroascorbate reductase; GR – glutathione reductase; g_s, stomatal conductance; H₂O₂ – hydrogen peroxide; ¹O₂ – singlet oxygen; O₂^{•-} – superoxide anion radical; •OH – hydroxyl radical; Pl_{Chr}, Pl_{Dyn} and Pl_{Tot} - chronic photoinhibition, dynamic photoinhibition and total photoinhibition; SD - stomatal density; SI - stomatal index; ROS - reactive oxygen species; TOC - α-tocopherol; V - violaxanthin; Z – zeaxanthin.

1. Introduction

Anthropogenic actions, mostly related to rising use of fossil fuels and land-use changes, have strongly contributed to the increase of atmospheric [CO₂] from ca. 280 in the pre-industrial period to the actual 400 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$. According to recent projections, depending on the greenhouse gas emission scenarios air [CO₂] could rise to between 421 and 936 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$, (or between 475 and 1313 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$, considering CO₂-equivalent concentrations that include the predicted concentrations of CH₄ and N₂O) by 2100. These will be accompanied by a global surface warming between 0.3-1.7°C (best scenario) and 2.6-4.8°C (worst scenario, without additional mitigation efforts), relative to 1986-2005 (IPCC, 2013; 2014).

This [CO₂] boost can affect fundamental plant processes such as photosynthesis and respiration (Woodward, 2002; Ainsworth and Rogers, 2007; Kirschbaum, 2011), ultimately altering plant growth, yield and crop quality (Luo et al., 1999; DaMATTA et al., 2010). The actual atmospheric [CO₂] is below the optimal for photosynthesis of C₃ crops. Therefore, enhanced [CO₂] is expected to increase net photosynthesis near or often above 50%, with trees showing the largest rise (Ainsworth and Rogers, 2007). However, projected global warming, concurrent to [CO₂] increase may compromise the beneficial effects of C fertilization, and affect flower viability, fruit development and yield (Prasad et al., 2003; Camargo, 2010), therefore constituting a major threat for many important agricultural crops. Indeed, heat modifies the use of solar energy, alters both the gas diffusion in the leaf mesophyll (Lambers et al., 2008) and photosynthetic pigment composition and content (Haldimann and Feller, 2004; Hasanuzzaman et al., 2013). Elevated temperatures also affect the water relations and evaporative demand, the fluidity and stability of membrane systems, as well as hormones and primary and secondary metabolites (Wahid et al., 2007). Collectively, these alterations could potentially disrupt cellular homeostasis and impair photosynthesis and other major physiological processes (Long et al., 2006; Suzuki and Mittler, 2006; Kirschbaum, 2011). In any case, elevated [CO₂] can modify plant responses to environmental variables (Boisvenue and Running, 2006). Therefore, to properly predict plant responses to rising temperatures and atmospheric [CO₂], studies must be undertaken considering both variables on a

long-term basis, given that their interaction can either exacerbate or cancel their single independent effects on leaf physiology (Way et al., 2015).

The harmful effects of heat stress is frequently linked to the enhanced accumulation of reactive oxygen species (ROS) (Suzuki and Mittler, 2006; Hasanuzzaman et al., 2013). The upregulation of mechanisms controlling the production/scavenging of highly reactive molecules is determinant to cell homeostasis and to plant survival to environmental stresses. Chloroplast (and cell) oxidative stress usually arises under conditions that reduce energy use by photochemical processes without a significant reduction in energy capture. This imbalance promotes the over-production of molecules in the excited state, both of Chl and O₂ (e.g., triplet state of chl (³Chl*), ¹chl, singlet oxygen (¹O₂)). Furthermore, O₂ reduction in photosystems (particularly in PSI) may occur, producing O₂^{•-} and, thereafter, H₂O₂ and OH[•], all of which can cause lipid peroxidation, bleaching of pigments (e.g., in P₆₈₀), protein oxidation (e.g., D1), enzyme inactivation and DNA degradation (Asada, 1994; Foyer, 2002; Logan, 2005). The control of such highly reactive molecules can be achieved indirectly, through the increase of energy dissipation mechanisms (e.g., photorespiration, pseudocyclic electron transport and the synthesis of photoprotective pigments) (Logan, 2005; Smirnov, 2005; Batista-Santos et al., 2011), or directly, acting on their production/scavenging. The latter includes the complementary overexpression of enzymes (e.g., SOD, APX, GR), as well as the action of hydrophilic (ascorbate and glutathione) and lipophilic (e.g., zeaxanthin, β-carotene and α-tocopherol) antioxidants (Foyer, 2002; Logan, 2005; Munné-Bosch, 2005; Smirnov, 2005).

Coffee, an evergreen tropical tree species, is one of the most heavily globally traded commodities. The world coffee production is based on *Coffea arabica* L. and *C. canephora* Pierre ex A. Froehner, which produce approximately 2/3 and 1/3 of crop yield, respectively. The optimal annual average temperature is one of the well-known differences between *C. arabica* (18-23°C) and *C. canephora* (22-26°C) (DaMATTA and Ramalho, 2006). Coffee crop chain of value generates an income of approximately US\$ 170,000 million and involves ca.100 million people worldwide, having a strong social and economic impact on

many tropical countries (Bunn et al., 2015). Noticeably, the coffee production is mostly based on small holders that are currently facing growing challenges from climate changes; under these circumstances, both the coffee yields and beverage quality can be profoundly impacted, thus potentially affecting not only producers but also the coffee industry and consumers as a whole. In fact, over the last decade, several modelling studies anticipated remarkable climate impacts on the coffee crop (especially *C. arabica*), with large worldwide losses on suitable areas and productivity, although coffee production is believed to have already been affected by climate changes due to the occurrence of severe droughts and high temperatures (Bunn et al., 2015; Craparo et al., 2015; van der Vossen et al., 2015). However, neither the positive effects of elevated [CO₂] on coffee photosynthesis (Ramalho et al., 2013b; DaMATTA et al., 2016), leaf mineral balance (Martins et al., 2014) and bean yield (Ghini et al., 2015), nor the role of CO₂ as a key player in coffee heat tolerance (Rodrigues et al., 2016), have been considered in those modelling studies, probably because this information has become available only very recently.

We previously demonstrated that both *C. arabica* and *C. canephora* species are remarkably heat tolerant up to 37/30°C, but at 42/34°C a threshold for irreversible nonstomatal deleterious effects on photosynthesis is reached, with greater impairments on *C. arabica*, particularly under normal air [CO₂] (Rodrigues et al., 2016). Photosystems and thylakoid electron transport were shown to be quite heat tolerant, contrasting to the enzymes related to energy metabolism, including RuBisCO, which were the most sensitive components. We also demonstrated that elevated [CO₂] does not provoke photosynthetic downregulation and remarkably mitigates the impact of temperature on both species, particularly at 42/34 °C, modifying the response to supra-optimal temperatures. Here we complement our previous studies with the central objective of exploring potential protective mechanisms against heat stress, and how these mechanisms are affected by the elevated [CO₂] in coffee. To reach these goals, we firstly assessed the occurrence of PSII photoinhibition (as a marker for photodamage), followed by an in-depth characterization of protective mechanisms, including dynamics of photosynthetic pigments, enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems, quantification of raffinose family

oligosaccharides (RFOs) and heat-shock protein pools, in addition to assessing the expression of selected genes with potential roles in heat acclimation.

2. Materials and methods

2.1 Plant material and experimental conditions

The plant materials were collected from the same experiments described in Rodrigues et al. (2016), therefore, using the same experimental conditions and treatments. In brief, three widely cropped coffee genotypes from the two main producing species, *C. arabica* L. (cvs. Icatu and IPR108) and *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (cv. Conilon Clone 153 - CL153), were evaluated. Plants, ca. 1.5 years of age, were transferred into two walk-in growth chambers (EHHF 10000, ARALAB, Portugal) differing in air [CO₂] supply: 380 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ (380-plants) or 700 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ (700-plants). Both groups of plants were then grown for 10 months in 28 L pots in a substrate consisting of a mixture of soil, peat, and sand (3:1:3, v/v/v), as optimized for coffee plants (Ramalho et al., 2013a), and fertilized as previously described (Ramalho et al., 2013b). Environmental conditions of temperature (25/20°C, day/night), irradiance (ca. 700-800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), RH (75%), and photoperiod (12 h) were provided to the plants, and permanently monitored along the whole period. The temperature was then gradually increased from 25/20°C up to 42/34°C in both growth chambers at a rate of 0.5°C day⁻¹, with 7 days of stabilization at 31/25, 37/30 and 42/34°C for evaluations.

All determinations were performed on newly matured leaves from the upper (illuminated) part of each plant. For biochemical evaluations, leaf material was collected after ca. 2 h of illumination from 6 to 8 plants of each genotype and used immediately or flash frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until analysis. Each biological replicate is a pool of leaves of each plant. Along the experiment the plants were maintained without restrictions in water, nutrients, and root development, the latter evaluated by visual examination at the end of the experiment after removing the plants from their pots (Rodrigues et al., 2016),

2.2 PSII photoinhibition status

The PSII photoinhibition indexes were calculated according to Werner et al.

(2002), and included: A) chronic photoinhibition (PI_{Chr}), representing the percent reduction in F_v/F_m at each temperature relative to the maximal F_v/F_m obtained during the entire experiment; B) dynamic photoinhibition (PI_{Dyn}), representing the decline in F_v/F_m that is fully reversible overnight, being measured as the percent reduction in midday F_v'/F_m' relative to F_v/F_m at each temperature, relative to the maximal F_v/F_m from the entire experiment; C) total photoinhibition ($PI_{Total}=PI_{Chr}+PI_{Dyn}$). The F_v/F_m and F_v'/F_m' represented the maximal photochemical efficiency of PSII and the actual PSII efficiency of energy conversion under light exposure, respectively. F_v/F_m and F_v'/F_m' were obtained under dark adapted or photosynthetic steady-state conditions, respectively, exactly as detailed in Rodrigues et al. (2016).

2.3 Photosynthetic pigment characterization

Carotenoids (Car) were assessed from four frozen leaf discs (each 0.5 cm²). Sample processing and subsequent reverse-phase HPLC were carried out as optimized for coffee (Ramalho et al., 1997) with minor adjustments, using an end-capped (C₁₈) 5- μ m Spherisorb ODS-2 column (250 x 4.6 mm). Detection was performed at 440 nm in an HPLC system (Beckman, System Gold, Tulsa, USA) coupled to a diode-array (Model 168; Beckman) detector, and identification and quantification were performed using individual sugar standards. The de-epoxidation state, involving xanthophyll cycle components, was calculated as $DEPS = (Zeaxanthin (Z) + 0.5 Antheraxanthin (A)) / (Violaxanthin(V) + A + Z)$.

Chlorophylls (Chls) from the same samples were extracted in 80% acetone, and quantified spectrophotometrically according to Lichtenthaler (1987).

2.4 Maximal activities of antioxidant enzymes

Unless otherwise indicated, enzyme activities were determined in chloroplast extracts (obtained using 3-4 g FW of leaf tissue), as described previously (Ramalho et al., 1998). Superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD, EC 1.15.1.1) was spectrophotometrically assessed at 550 nm. Ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) was assessed through ascorbate consumption (at 290 nm, 120 s, 25°C) using an extinction coefficient of 2.8 mM⁻¹ cm⁻¹ for calculations. Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) was assessed through the NADPH

oxidation (at 340 nm, 120 s, 25°C). Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) was assessed in whole-leaf extracts (prepared using 200 mg FW of leaf tissue), as described in Fortunato et al. (2010). Enzyme activity was evaluated through the rate of H₂O₂ consumption (240 nm, 120 s, 25°C), and a freshly made H₂O₂ standard curve (0-1 M) was used for quantification.

2.5 Quantification of non-enzymatic antioxidants

Ascorbate (ASC) and α -tocopherol (TOC) determinations were performed on 100 and 200 mg FW of leaf tissue, respectively, based on HPLC methods, as described in detail in Fortunato et al. (2010).

2.6 HSP70 quantification

For the heat shock protein 70 (HSP70) assays, 100 mg FW of frozen leaf tissues per plant were homogenized in 1 mL 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), containing 20 mM β -mercaptoethanol, 2 mM dithiothreitol (DTT), 2% triton X-100, 4% (v/v) 'Complete-protease inhibitor cocktail' with EDTA, 10% polyvinylpolypyrrolidone, and 10% glycerol. The homogenate was then centrifuged (10,000 g, 20 min, 4 °C) and the supernatant was used for HSP70 quantification through Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), using Flat-bottomed micro-ELISA plates (Costar, Corning, NY, USA) as described in Njemini et al. (2003) with minor modifications. Plates were covered with the primary antibody (100 μ L; 5 μ g mL⁻¹) diluted in 100 mM carbonate buffer (pH 9.6). After incubating the plates at 37°C during 90 min, the coated plates were washed four times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20 (PBS/T) and non-specific binding sites blocked by incubation with 300 μ L of PBS/T containing 0.1% BSA (PBS/T/BSA) for 60 min at 37°C. After washing, 50 μ L of the standard and samples were added and the plates incubated for 90 min at 37°C. Plates were then washed four times and 100 μ L of mouse monoclonal anti-HSP70 (1/400) diluted in PBS/T were added. After 60 min on a shaker at 37°C, plates were washed four times and incubated with 100 μ L of the diluted (1/10,000 in PBS/T/BSA) secondary antibody (anti-mouse IgG, peroxidase, Sigma-Aldrich, USA) for 60 min at 37°C. Thereafter, plates were washed and 100 μ L of ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) substrate were added. After 45 min at 37°C, the reaction was stopped with 50 μ L of 1 N H₂SO₄ and the

absorbance was determined at 405 nm using a microplate reader. HSP70 concentrations were detected by comparing sample absorbance with the absorbance of a reference purified HSP70 protein.

Total soluble protein contents of the enzyme extracts followed Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

2.7 Raffinose family oligosaccharides quantification

RFOs evaluation was performed in samples of 150 mg of powdered frozen material, following the HPLC method for soluble sugars described in Ramalho et al. (2013b), with some modifications. To overcome the presence of non-pure peaks the separation of sugars was performed using a Sugar-Pak 1 column (300 x 6.5 mm, Waters) at 90°C, with H₂O as the eluent (containing 50 mg EDTA-Ca L⁻¹ H₂O) and a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Another 20 µL aliquot of each sample was injected through a DionexCarboPac PA1 analytical column (4 x 250 mm, Thermo Scientific, USA) coupled to a DionexCarboPac PA1 Guard (4 x 50 mm) at 20°C. Ultrapure water and 300 mM NaOH were used as eluents (water from 0 to 50 min; NaOH from 50 to 65 min; and water from 65 to 80 min for re-equilibration) at a 1 mL min⁻¹ flow rate. A refractive index detector (Model 2414, Waters, USA) was used for sugar detection. Sugars were quantified using specific standard curves.

2.8 Expression studies of selected genes

Total RNA was isolated and quantified as described in Goulão et al. (2012). One microgram of DNA-free total RNA was used to synthesize first-strand cDNAs using oligo-(dT) 18 primers and the SuperScript II first-strand synthesis system (Invitrogen, USA).

Genes related to the antioxidative system and other protection proteins were selected for the expression studies (Table 1), with all procedures performed as described in Goulao et al. (2012). Primers were designed using the *C. canephora* sequences (<http://www.coffee-genome.org/coffeacanephora>) with Primer3 software. Primer length was set to 19-20 bp, with a GC content between 45%-60% and a melting temperature (T_m value) between 62-65°C.

Table 1 - Selected genes used for real-time qPCR studies, which are related to the oxidative stress control and/or repair mechanisms, homologies, primer sequences, access number on NCBI GenBank and amplicon size (bp).

| Gene Symbol | Primer Sequence (5'-3') | Gene Description | NCBI GenBank Access Number | Amplicon Size (bp) |
|--------------------|--|--|------------------------------------|---------------------------|
| <i>UBQ *</i> | F: AACATTGAGGGTGGTTCTGTTC R: CTCCAAGTGCACCTCAAATC | Ubiquitin | AF297089 | 200 |
| <i>HSP70</i> | F: GGGAAGCAATTGACACCAAG R: AGCCACCAGATACTGCATCC | Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic | GSCOCT00018441001;Name=Cc10_g11150 | 150 |
| <i>ELIP</i> | F: GCCATGATAGGGTTTGTTC R: GTCCAATGAACCATTCAG | Chloroplast early light-induced protein | GSCOCT00026140001;Name=Cc03_g04300 | 101 |
| <i>Chape 20</i> | F: GTTAAAGCTGCCGCTGTTG R: CTCACCTCCTTGAGGTTTCG | Chloroplast 20 kDa chaperonin | GSCOCT00041526001;Name=Cc06_g12530 | 150 |
| <i>Chape 60</i> | F: GGATAGTGAAGCCCTTGC R: CCCAGGAGCTTTTATTGCAC | Mitochondria chaperonin CPN60 | GSCOCT00026540001;Name=Cc03_g07040 | 80 |
| <i>CAT</i> | F: CTACTCCCCTCGCGGTAT R: CTGTCTGGTGCAAATGAACG | Catalase isozyme 1 | GSCOCT00036969001;Name=Cc07_g11710 | 150 |
| <i>CuSOD 1</i> | F: CCCTTGAGACACAACGAAT R: GGCAGTACCATCTTGACCA | Superoxide dismutase [Cu-Zn] | GSCOCT00012962001;Name=Cc02_g32280 | 141 |
| <i>CuSOD 2</i> | F: GGGGCTCTATCCAATTCCTC R: GGTAAAATGAGGCCAGTG | Superoxide dismutase [Cu-Zn] | GSCOCT00040610001;Name=Cc06_g23170 | 150 |
| <i>FeSOD</i> | F: TGCAACCCTCTTGTGTGGA R: ATTGCCGCA TTCCAAGATAC | Chloroplast superoxide dismutase [Fe] | GSCOCT00031536001;Name=Cc10_g09500 | 141 |
| <i>APX Cyt</i> | F: TCTGGATTTGAGGGACCTTG R: GTCAGATGGAAGCCGGATAA | Cytosol ascorbate peroxidase | GSCOCT00023633001;Name=Cc06_g03490 | 108 |
| <i>APX Chl</i> | F: CACCTGCTGCTCATTTACG R: GACCTTCCAATGTGTGTG | Chloroplast ascorbate peroxidase | GSCOCT00031893001;Name=Cc10_g12080 | 100 |
| <i>Toc Mt</i> | F: GCAGATGGGTCAATTCGATTT R: GGCGAAAGATCCCTATGAC | Chloroplast probable tocopherol O-methyltransferase | GSCOCT00040496001;Name=Cc06_g18700 | 146 |
| <i>Toc Cy</i> | F: CCTAACTTTTGGGGAAGC R: GATGCCAAAGGGGAGTAAC | Chloroplast tocopherol cyclase | GSCOCT00017269001;Name=Cc08_g09240 | 150 |

* Used to check for DNA contamination in RNA samples and positive control

Amplicon length ranges were set to be between 80-150 bp. The probability of formation of hairpin structures and primer dimerization was subsequently checked using the Oligo Calculator algorithm. To determine the specificity of the primer pairs used in this study, melting/dissociation curve analysis was performed following the RT-qPCR experiment. A single peak in the obtained melting curve confirmed the specificity of the amplicon, and no signal was detected in the negative controls for all of the tested primers. All qRT-PCR reactions and relative gene expression were calculated after normalization with the reference genes ubiquitin-conjugating enzyme E2 (UbQ2) and eukaryotic initiation factor 4 α (eIF-4).

2.9 Statistical analysis

Data were analyzed using two-way ANOVAs ($P < 0.05$) to evaluate the differences between the two growth atmospheric [CO₂] and among the several temperature treatments, as well as their interaction, followed by a Tukey's test for mean comparisons, except when otherwise stated. Each ANOVA was performed independently for each of the studied genotypes. Overall, the [CO₂] x temperature interaction for most parameters was significant. To the sake of simplicity we do not consider also the comparison between genotypes within each [CO₂] and temperature.

The relative expression ratio of each target gene was computed based on its real-time PCR efficiency and the crossing point (CP) difference of a target sample *versus* a control (25/20°C, 380 μ L CO₂ L⁻¹ air) within each genotype. Data analysis was performed using the Relative Expression Software Tool (REST 2009), available at <http://www.genequantification.de/rest-2009.html>. A 95% confidence level was adopted for all tests.

3. Results

3.1 PSII photoinhibition

Overall, dynamic PSII photoinhibition (PI_{dyn}) was mostly unresponsive to temperature and [CO₂] (Fig. 1A). Even so, CL153 380-plants maintained higher PI_{dyn} values than those of under 700 μ L CO₂ L⁻¹ throughout the experiment. In

contrast, chronic PSII photoinhibition (PI_{chr}) was manifested almost exclusively at 42/34°C (Fig. 1B) and in the 380-plants, particularly in Icatu. Reflecting PI_{dyn} and PI_{chr} variations at 42/34°C, the total photoinhibition (PI_{total}) showed significantly higher values in the 380-plants of all genotypes (maximal in Icatu), as well as in the 700-plants of *C. arabica* genotypes (Fig. 1C).

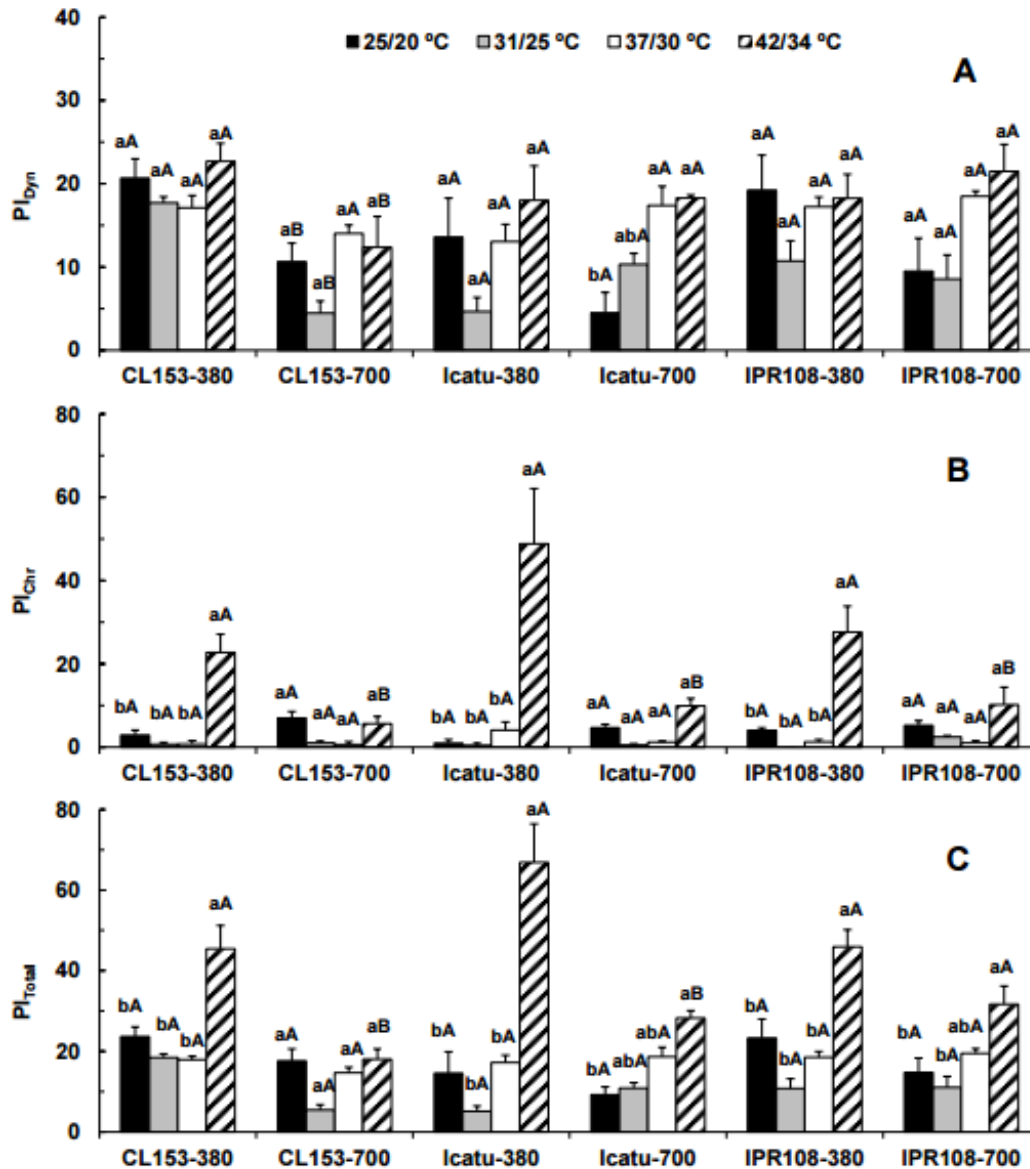


Figure 1 - Leaf fluorescence parameters related to the photoinhibition status of PSII in *C. canephora* cv. Conilon (CL153) and *C. arabica* (Icatu and IPR108) plants, which were grown under 380 or 700 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ and submitted to control (25/20°C, day/night) and supra-optimal temperatures of 31/25°C, 37/30°C or 42/34°C. The parameters include the calculation of A) dynamic photoinhibition (PI_{dyn}), B) chronic photoinhibition (PI_{chr}), and C) total photoinhibition (PI_{total}). For each parameter, the mean values \pm SE (n=5-8) followed by different letters express significant differences between temperature treatments for the same CO₂ level, separately for each genotype (a, b), or between CO₂ levels for each temperature treatment, separately for each genotype (A, B).

3.2 Photosynthetic pigment

At control temperature (25/20°C), enhanced [CO₂] promoted a consistent tendency towards higher contents of several carotenoids (Car) in CL153 (Table 2), although significantly only for neoxanthin and carotenes. No changes were observed in total Chl contents (Table 3). The *C. arabica* plants showed a somewhat different pattern by the maintenance or even slight lower Car contents under high [CO₂], namely in the pool of xanthophyll cycle pigments (VAZ), carotenes and total Car.

In *C. canephora* plants exposed to supra-optimal temperatures, decreases in most pigments (neoxanthin, VAZ pool, lutein, β- and total carotenes) were observed in the 700-plants. Given that the 380-plants maintained or slightly increased (lutein, carotenes) their pigment contents (when compared to 25/20°C), differences between CO₂ conditions emerged for most Car, significantly for neoxanthin, VAZ pool, lutein and total Car under 42/34°C.

In *C. arabica* genotypes, [CO₂] treatment caused marginal/occasional changes in pigment composition at high temperatures. Such changes were mostly restricted to 700-plants of IPR108, which at 37/30°C showed lower contents of neoxanthin, VAZ pool, DEPS, lutein, β- and total carotenes, total Car, and Chl (*a+b*) relative to their 380-counterparts. However, no significant differences associated with [CO₂] treatments could be found at 42/34°C. In contrast to [CO₂] treatment, increasing temperature remarkably impacted the *C. arabica* genotypes regardless of [CO₂], as denoted by the increases in total Chls and total Car, reaching maximal values at 37/30°C or 42/34°C. The rise in total Car was related to increases in neoxanthin, Z and, especially, lutein and β-carotene (Table 2). In fact, at 42/34°C, rises in lutein pools reached 84% and 105% in Icatu, and 47% and 65% in IPR108, for the 380- and 700-plants, respectively, whereas the β-carotene pools increased ca. 40% in Icatu under both [CO₂] conditions. In IPR108, maximal increases in β-carotene were found at 37/30°C, although with significance only for the 700-plants (42%).

Table 3 - Changes in leaf content of total chlorophyll, Chl (*a+b*) (mg g⁻¹ DW), and in the ratios of *a*-to-*b* chlorophyll and of total chlorophyll-to-total carotenoids, obtained through spectrophotometric determinations, in *C. canephora* cv. Conilon (CL153) and *C. arabica* (Icatu and IPR108) plants, grown under 380 or 700 $\mu\text{LCO}_2 \text{ L}^{-1}$, at control (25/20°C, day/night) and supra-optimal temperatures of 31/25°C, 37/30°C and 42/34°C. For each parameter, the mean values \pm SE (n=6) followed by different letters express significant differences between temperatures for the same CO₂ treatment, separately for each genotype (a, b, c, d), or between CO₂ treatments for each temperature, separately for each genotype (A, B).

| Pigment | Genotype | [CO ₂] ($\mu\text{L L}^{-1}$) | Temperature (day/night) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|-------------------------|-------|-------|------|---------|-------|-------|------|---------|-------|-------|------|---------|-------|-------|------|----|
| | | | 25/20°C | | | | 31/25°C | | | | 37/30°C | | | | 42/34°C | | | | |
| Chl (<i>a+b</i>) (mg g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 10.39 | \pm | 0.70 | aA | 11.41 | \pm | 0.81 | aA | 11.76 | \pm | 0.81 | aA | 11.87 | \pm | 0.70 | aA | |
| | | 700 | 10.38 | \pm | 0.81 | aA | 9.40 | \pm | 0.70 | aA | 10.94 | \pm | 0.81 | aA | 8.30 | \pm | 0.70 | aB | |
| | Icatu | 380 | 9.81 | \pm | 0.51 | bA | 11.00 | \pm | 0.51 | abA | 12.16 | \pm | 0.51 | aA | 11.06 | \pm | 0.51 | abA | |
| | | 700 | 9.08 | \pm | 0.51 | bA | 10.73 | \pm | 0.51 | abA | 11.56 | \pm | 0.59 | aA | 11.81 | \pm | 0.51 | aA | |
| | IPR 108 | 380 | 11.28 | \pm | 0.64 | cA | 14.32 | \pm | 0.74 | abA | 15.26 | \pm | 0.74 | aA | 12.33 | \pm | 0.74 | bcA | |
| | | 700 | 9.45 | \pm | 0.64 | bB | 9.44 | \pm | 0.64 | bB | 12.71 | \pm | 0.64 | aB | 11.11 | \pm | 0.64 | abA | |
| | Chl (<i>a/b</i>) (g g ⁻¹) | CL 153 | 380 | 3.33 | \pm | 0.04 | aA | 3.44 | \pm | 0.04 | aA | 2.84 | \pm | 0.04 | bB | 2.62 | \pm | 0.04 | cA |
| | | | 700 | 3.40 | \pm | 0.04 | aA | 3.28 | \pm | 0.04 | aB | 3.07 | \pm | 0.05 | bA | 2.70 | \pm | 0.04 | cA |
| Icatu | | 380 | 3.29 | \pm | 0.06 | aA | 3.20 | \pm | 0.06 | aA | 3.22 | \pm | 0.07 | aA | 2.85 | \pm | 0.06 | bA | |
| | | 700 | 3.13 | \pm | 0.06 | aA | 3.15 | \pm | 0.06 | aA | 2.89 | \pm | 0.06 | bB | 2.80 | \pm | 0.06 | bA | |
| IPR 108 | | 380 | 3.41 | \pm | 0.04 | aA | 3.29 | \pm | 0.05 | aA | 2.98 | \pm | 0.04 | bA | 2.67 | \pm | 0.04 | cA | |
| | | 700 | 3.24 | \pm | 0.04 | aB | 3.09 | \pm | 0.04 | abB | 3.02 | \pm | 0.04 | bA | 2.76 | \pm | 0.04 | cA | |
| Chl (<i>a+b</i>)/Total Carotenoids (g g ⁻¹) | | CL 153 | 380 | 4.98 | \pm | 0.09 | aA | 5.08 | \pm | 0.10 | aA | 5.10 | \pm | 0.10 | aA | 4.80 | \pm | 0.09 | aA |
| | | | 700 | 4.89 | \pm | 0.09 | aA | 5.11 | \pm | 0.09 | aA | 5.10 | \pm | 0.09 | aA | 4.90 | \pm | 0.10 | aA |
| | Icatu | 380 | 4.92 | \pm | 0.10 | aA | 4.97 | \pm | 0.10 | aA | 4.83 | \pm | 0.10 | aA | 4.25 | \pm | 0.10 | bA | |
| | | 700 | 4.78 | \pm | 0.10 | aA | 4.78 | \pm | 0.10 | aA | 4.73 | \pm | 0.12 | aA | 4.23 | \pm | 0.10 | bA | |
| | IPR 108 | 380 | 4.82 | \pm | 0.12 | aA | 5.07 | \pm | 0.14 | aA | 4.79 | \pm | 0.14 | abA | 4.35 | \pm | 0.12 | bA | |
| | | 700 | 4.78 | \pm | 0.12 | aA | 5.21 | \pm | 0.12 | aA | 4.91 | \pm | 0.12 | aA | 4.17 | \pm | 0.12 | bA | |

Table 2 - Changes in leaf content (mg g⁻¹ DW) of xanthophylls and carotenes, obtained through HPLC determinations in *C. canephora* cv. Conilon (CL153) and *C. arabica* (Icatu and IPR108) plants, grown under 380 or 700 $\mu\text{LCO}_2 \text{ L}^{-1}$, at control (25/20°C, day/night) and supra-optimal temperatures of 31/25°C, 37/30°C and 42/34°C. For each parameter, the mean values \pm SE (n=6) followed by different letters express significant differences between temperatures for the same CO₂ treatment, separately for each genotype (a, b, c, d), or between CO₂ treatments for each temperature, separately for each genotype (A, B).

| Pigment | Genotype | [CO ₂] ($\mu\text{L L}^{-1}$) | Temperature (day/night) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--|-------------------------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|---------|--|--|--|--|
| | | | 25/20°C | | | | 31/25°C | | | | 37/30°C | | | | 42/34°C | | | | |
| Neoxanthin (mg g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 0.206 | \pm 0.019 | aB | 0.225 | \pm 0.019 | aA | 0.255 | \pm 0.021 | aA | 0.245 | \pm 0.019 | aA | | | | | |
| | | 700 | 0.267 | \pm 0.019 | aA | 0.216 | \pm 0.021 | abA | 0.233 | \pm 0.021 | abA | 0.182 | \pm 0.019 | bB | | | | | |
| | Icatu | 380 | 0.216 | \pm 0.012 | aA | 0.224 | \pm 0.010 | aA | 0.245 | \pm 0.010 | aA | 0.241 | \pm 0.010 | aA | | | | | |
| | | 700 | 0.218 | \pm 0.012 | bA | 0.223 | \pm 0.010 | bA | 0.263 | \pm 0.010 | aA | 0.252 | \pm 0.010 | abA | | | | | |
| | IPR 108 | 380 | 0.276 | \pm 0.016 | aA | 0.311 | \pm 0.016 | aA | 0.322 | \pm 0.016 | aA | 0.276 | \pm 0.014 | aA | | | | | |
| | | 700 | 0.216 | \pm 0.014 | bB | 0.291 | \pm 0.016 | aA | 0.266 | \pm 0.014 | abB | 0.239 | \pm 0.014 | abA | | | | | |
| | Zeaxanthin (mg g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 0.041 | \pm 0.007 | bA | 0.046 | \pm 0.009 | bA | 0.036 | \pm 0.007 | bA | 0.085 | \pm 0.009 | aA | | | | |
| | | | 700 | 0.057 | \pm 0.007 | aA | 0.030 | \pm 0.007 | aA | 0.042 | \pm 0.009 | aA | 0.039 | \pm 0.009 | aB | | | | |
| Icatu | | 380 | 0.053 | \pm 0.009 | abA | 0.037 | \pm 0.009 | bA | 0.032 | \pm 0.010 | bB | 0.083 | \pm 0.010 | aA | | | | | |
| | | 700 | 0.066 | \pm 0.010 | abA | 0.039 | \pm 0.009 | bA | 0.064 | \pm 0.010 | abA | 0.075 | \pm 0.009 | aA | | | | | |
| IPR 108 | | 380 | 0.032 | \pm 0.010 | bA | 0.028 | \pm 0.008 | bA | 0.101 | \pm 0.009 | aA | 0.080 | \pm 0.008 | aA | | | | | |
| | | 700 | 0.040 | \pm 0.009 | bA | 0.040 | \pm 0.008 | bA | 0.041 | \pm 0.008 | bB | 0.089 | \pm 0.008 | aA | | | | | |
| V+A+Z (mg g ⁻¹ DW) | | CL 153 | 380 | 0.318 | \pm 0.022 | aA | 0.318 | \pm 0.022 | aA | 0.342 | \pm 0.026 | aA | 0.288 | \pm 0.022 | aA | | | | |
| | | | 700 | 0.341 | \pm 0.026 | aA | 0.249 | \pm 0.026 | abB | 0.288 | \pm 0.026 | abA | 0.221 | \pm 0.022 | bB | | | | |
| | Icatu | 380 | 0.375 | \pm 0.019 | abA | 0.409 | \pm 0.019 | aA | 0.337 | \pm 0.019 | bB | 0.306 | \pm 0.019 | bA | | | | | |
| | | 700 | 0.300 | \pm 0.022 | bB | 0.407 | \pm 0.019 | aA | 0.416 | \pm 0.022 | aA | 0.312 | \pm 0.019 | bA | | | | | |
| | IPR 108 | 380 | 0.451 | \pm 0.031 | abA | 0.482 | \pm 0.031 | aA | 0.494 | \pm 0.027 | aA | 0.348 | \pm 0.027 | bA | | | | | |
| | | 700 | 0.338 | \pm 0.027 | aB | 0.428 | \pm 0.031 | aA | 0.392 | \pm 0.027 | aB | 0.349 | \pm 0.031 | aA | | | | | |
| | DEPS | CL 153 | 380 | 0.169 | \pm 0.026 | bA | 0.198 | \pm 0.030 | bA | 0.186 | \pm 0.026 | bA | 0.359 | \pm 0.030 | aA | | | | |
| | | | 700 | 0.214 | \pm 0.026 | aA | 0.118 | \pm 0.026 | aB | 0.224 | \pm 0.030 | aA | 0.204 | \pm 0.026 | abB | | | | |
| Icatu | | 380 | 0.180 | \pm 0.028 | bA | 0.103 | \pm 0.026 | bA | 0.121 | \pm 0.030 | bA | 0.337 | \pm 0.030 | aA | | | | | |
| | | 700 | 0.248 | \pm 0.030 | abA | 0.125 | \pm 0.026 | cA | 0.178 | \pm 0.030 | bcA | 0.307 | \pm 0.026 | aA | | | | | |
| IPR 108 | | 380 | 0.084 | \pm 0.024 | cB | 0.072 | \pm 0.019 | cB | 0.219 | \pm 0.022 | bA | 0.341 | \pm 0.019 | aA | | | | | |
| | | 700 | 0.187 | \pm 0.022 | bA | 0.136 | \pm 0.020 | bA | 0.124 | \pm 0.020 | bB | 0.337 | \pm 0.019 | aA | | | | | |
| Lutein (mg g ⁻¹ DW) | | CL 153 | 380 | 0.622 | \pm 0.041 | bA | 0.709 | \pm 0.041 | bA | 0.756 | \pm 0.047 | abA | 0.886 | \pm 0.041 | aA | | | | |
| | | | 700 | 0.719 | \pm 0.047 | aA | 0.519 | \pm 0.041 | bB | 0.674 | \pm 0.047 | abA | 0.603 | \pm 0.041 | abB | | | | |
| | Icatu | 380 | 0.637 | \pm 0.037 | cA | 0.704 | \pm 0.037 | cA | 0.878 | \pm 0.037 | bA | 1.17 | \pm 0.037 | aA | | | | | |
| | | 700 | 0.560 | \pm 0.043 | cA | 0.690 | \pm 0.037 | cA | 0.911 | \pm 0.037 | bA | 1.15 | \pm 0.037 | aA | | | | | |
| | IPR 108 | 380 | 0.828 | \pm 0.061 | bA | 0.846 | \pm 0.053 | bA | 1.226 | \pm 0.053 | aA | 1.21 | \pm 0.053 | aA | | | | | |
| | | 700 | 0.672 | \pm 0.053 | cA | 0.846 | \pm 0.061 | bcA | 0.936 | \pm 0.053 | abB | 1.11 | \pm 0.053 | aA | | | | | |

Continued from table 2 on next page

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------|------------|-------|---|-------|-----|-------|---|-------|-----|-------|---|-------|-----|-------|---|-------|-----|
| α-Carotene (mg g⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 0.163 | ± | 0.032 | bB | 0.194 | ± | 0.032 | abA | 0.298 | ± | 0.037 | aA | 0.198 | ± | 0.032 | abA |
| | | 700 | 0.271 | ± | 0.032 | aA | 0.190 | ± | 0.032 | aA | 0.273 | ± | 0.037 | aA | 0.179 | ± | 0.032 | aA |
| | Icatu | 380 | 0.177 | ± | 0.016 | bA | 0.164 | ± | 0.016 | bA | 0.310 | ± | 0.019 | aA | 0.145 | ± | 0.016 | bA |
| | | 700 | 0.164 | ± | 0.019 | bA | 0.168 | ± | 0.016 | bA | 0.249 | ± | 0.016 | aB | 0.172 | ± | 0.019 | bA |
| | IPR 108 | 380 | 0.243 | ± | 0.024 | abA | 0.264 | ± | 0.024 | aA | 0.256 | ± | 0.024 | aA | 0.160 | ± | 0.021 | bA |
| | | 700 | 0.137 | ± | 0.021 | bB | 0.241 | ± | 0.024 | aA | 0.261 | ± | 0.024 | aA | 0.147 | ± | 0.021 | bA |
| β-Carotene (mg g⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 0.237 | ± | 0.015 | aB | 0.287 | ± | 0.015 | aA | 0.258 | ± | 0.018 | aA | 0.263 | ± | 0.015 | aA |
| | | 700 | 0.286 | ± | 0.015 | aA | 0.226 | ± | 0.015 | bB | 0.234 | ± | 0.018 | abA | 0.195 | ± | 0.015 | bB |
| | Icatu | 380 | 0.240 | ± | 0.018 | bA | 0.294 | ± | 0.018 | abA | 0.315 | ± | 0.018 | aA | 0.330 | ± | 0.018 | aA |
| | | 700 | 0.227 | ± | 0.018 | bA | 0.276 | ± | 0.018 | abA | 0.310 | ± | 0.018 | aA | 0.328 | ± | 0.018 | aA |
| | IPR 108 | 380 | 0.330 | ± | 0.014 | abA | 0.341 | ± | 0.014 | aA | 0.368 | ± | 0.014 | aA | 0.285 | ± | 0.012 | bA |
| | | 700 | 0.227 | ± | 0.012 | bB | 0.313 | ± | 0.014 | aA | 0.323 | ± | 0.012 | aB | 0.298 | ± | 0.012 | aA |
| (α+β) Carotene (mg g⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 0.400 | ± | 0.022 | bB | 0.481 | ± | 0.034 | abA | 0.556 | ± | 0.019 | aA | 0.461 | ± | 0.043 | abA |
| | | 700 | 0.557 | ± | 0.043 | aA | 0.416 | ± | 0.037 | abA | 0.507 | ± | 0.023 | aA | 0.374 | ± | 0.041 | bA |
| | Icatu | 380 | 0.418 | ± | 0.025 | bA | 0.458 | ± | 0.013 | bA | 0.581 | ± | 0.030 | aA | 0.475 | ± | 0.036 | abA |
| | | 700 | 0.371 | ± | 0.019 | bA | 0.444 | ± | 0.030 | abA | 0.559 | ± | 0.045 | aA | 0.484 | ± | 0.012 | abA |
| | IPR 108 | 380 | 0.572 | ± | 0.036 | aA | 0.605 | ± | 0.027 | aA | 0.624 | ± | 0.016 | aA | 0.446 | ± | 0.023 | bA |
| | | 700 | 0.364 | ± | 0.016 | bB | 0.553 | ± | 0.038 | aA | 0.550 | ± | 0.029 | aA | 0.445 | ± | 0.025 | abA |
| (α/β) Carotene (g g⁻¹) | CL 153 | 380 | 0.697 | ± | 0.089 | bA | 0.669 | ± | 0.089 | bA | 1.164 | ± | 0.102 | aA | 0.737 | ± | 0.089 | bA |
| | | 700 | 0.882 | ± | 0.089 | aA | 0.821 | ± | 0.089 | aA | 1.169 | ± | 0.102 | aA | 0.879 | ± | 0.089 | aA |
| | Icatu | 380 | 0.742 | ± | 0.073 | bA | 0.570 | ± | 0.073 | bcA | 1.051 | ± | 0.084 | aA | 0.432 | ± | 0.073 | cA |
| | | 700 | 0.639 | ± | 0.073 | abA | 0.612 | ± | 0.073 | abA | 0.855 | ± | 0.073 | aA | 0.523 | ± | 0.084 | bA |
| | IPR 108 | 380 | 0.731 | ± | 0.077 | aA | 0.778 | ± | 0.077 | aA | 0.705 | ± | 0.077 | aA | 0.583 | ± | 0.067 | aA |
| | | 700 | 0.499 | ± | 0.077 | bB | 0.763 | ± | 0.077 | abA | 0.818 | ± | 0.077 | aA | 0.495 | ± | 0.067 | bA |
| Total Carotenoids (mg g⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 1.55 | ± | 0.12 | aA | 1.73 | ± | 0.12 | aA | 1.91 | ± | 0.13 | aA | 1.88 | ± | 0.12 | aA |
| | | 700 | 1.75 | ± | 0.13 | aA | 1.43 | ± | 0.12 | aA | 1.70 | ± | 0.13 | aA | 1.38 | ± | 0.12 | aB |
| | Icatu | 380 | 1.63 | ± | 0.07 | cA | 1.79 | ± | 0.07 | bcA | 2.04 | ± | 0.07 | abA | 2.19 | ± | 0.07 | aA |
| | | 700 | 1.39 | ± | 0.08 | cB | 1.89 | ± | 0.08 | bA | 2.24 | ± | 0.08 | aA | 2.20 | ± | 0.07 | aA |
| | IPR 108 | 380 | 2.13 | ± | 0.14 | bA | 2.29 | ± | 0.14 | bA | 2.82 | ± | 0.12 | aA | 2.36 | ± | 0.14 | abA |
| | | 700 | 1.59 | ± | 0.12 | bB | 2.12 | ± | 0.14 | aA | 2.14 | ± | 0.12 | aB | 2.14 | ± | 0.12 | aA |
| (V+A+Z)/Total Carotenoids (g g⁻¹) | CL 153 | 380 | 0.205 | ± | 0.005 | aA | 0.184 | ± | 0.005 | bB | 0.179 | ± | 0.006 | bA | 0.153 | ± | 0.005 | cA |
| | | 700 | 0.193 | ± | 0.006 | aA | 0.201 | ± | 0.006 | aA | 0.169 | ± | 0.006 | bA | 0.159 | ± | 0.005 | bA |
| | Icatu | 380 | 0.230 | ± | 0.006 | aA | 0.227 | ± | 0.006 | aA | 0.165 | ± | 0.006 | bB | 0.140 | ± | 0.006 | cA |
| | | 700 | 0.216 | ± | 0.007 | aA | 0.232 | ± | 0.006 | aA | 0.186 | ± | 0.007 | bA | 0.143 | ± | 0.006 | cA |
| | IPR 108 | 380 | 0.213 | ± | 0.006 | aA | 0.210 | ± | 0.006 | aA | 0.173 | ± | 0.005 | bA | 0.149 | ± | 0.006 | cA |
| | | 700 | 0.212 | ± | 0.005 | aA | 0.203 | ± | 0.005 | aA | 0.182 | ± | 0.005 | bA | 0.163 | ± | 0.005 | bA |

Specifically regarding the photoprotective Z, moderately low values were maintained over the course of the experiment, but at 42/34°C significant Z increases (in parallel with moderate increases in DEPS) were observed in Icatu and IPR108 regardless of [CO₂], as well as in CL153 380-plants. Furthermore at 42/34°C most pigments (with the referred exceptions related to lutein and β-carotene) tended to lower concentrations than those observed at 37/30°C.

A moderate rise in total Chl was observed in *C. arabica* genotypes for both CO₂ treatments, mostly until 37/30°C, as compared to 25/20°C values. In CL153 temperature rising did not provoke significant changes in total Chl content within each [CO₂]. However, at 42/34°C the CL153 700-plants displayed lower Chl content than 380-plants, resulting from slight divergent shifts promoted by temperature in these plant groups (Table 3). The values of Chl (*a/b*) ratio were similar between [CO₂], but decreased at the two highest temperatures in all genotypes. Finally, the total Chl-to-total Car ratio, reflecting the light capture-to-dissipation pigment ratio, was quite stable until 37/30°C, but strongly decreased at 42/34°C in the *C. arabica* genotypes. No differences were found in this ratio in response to [CO₂] over the entire experiment in all genotypes.

3.3 Antioxidant enzyme activities

The activities of the antioxidant enzymes (Table 4) showed some differences at control temperature among genotypes in response to [CO₂], although the values were maintained within the range usually observed for genotypes of both *C. arabica* and *C. canephora* (Ramalho et al., 1998; Chaves et al., 2008; Fortunato et al., 2010; Pompelli et al., 2010). For all enzymes (Cu,Zn-SOD, APX, GR, CAT), IPR108 700-plants showed lower activities than 380-plants. In Icatu and CL153 that same trend was observed for GR and CAT, contrasting to higher activities observed in the 700-plants for APX and Cu,Zn-SOD (significantly only for the latter).

Table 4 - Changes in chloroplastic maximal activities of the enzyme antioxidants Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), as well as in cellular catalase in *C. canephora* cv. Conilon (CL153) and *C. arabica* (Icatu and IPR108) plants, grown under 380 or 700 $\mu\text{LCO}_2 \text{ L}^{-1}$, at control (25/20°C, day/night) and maximal temperature exposure (42/34°C). For each parameter, the mean values \pm SE (n=4) followed by different letters express significant differences between temperatures for the same CO_2 treatment, separately for each genotype (a, b), or between CO_2 treatments for each temperature, separately for each genotype (A, B).

| Enzyme | Genotype | [CO ₂] ($\mu\text{L L}^{-1}$) | Temperature (day/night) | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|-------------------------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| | | | 25/20°C | | | 37/30°C | | | 42/34°C | | | | | | |
| Cu,Zn-SOD (Units g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 449 | \pm | 4 | aB | 423 | \pm | 5 | aA | 426 | \pm | 10 | aB | |
| | | 700 | 537 | \pm | 7 | aA | 444 | \pm | 7 | bA | 525 | \pm | 8 | aA | |
| | Icatu | 380 | 523 | \pm | 4 | bB | 431 | \pm | 14 | cA | 602 | \pm | 9 | aA | |
| | | 700 | 648 | \pm | 11 | aA | 413 | \pm | 3 | cA | 498 | \pm | 9 | bB | |
| | IPR 108 | 380 | 568 | \pm | 14 | aA | 437 | \pm | 9 | bB | 555 | \pm | 13 | aA | |
| | | 700 | 450 | \pm | 4 | cB | 694 | \pm | 3 | aA | 577 | \pm | 7 | bA | |
| | APX (mmol ASC min ⁻¹ g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 7.23 | \pm | 1.15 | bA | 13.05 | \pm | 1.27 | aA | 3.94 | \pm | 1.10 | bA |
| | | | 700 | 9.85 | \pm | 0.61 | aA | 8.40 | \pm | 0.78 | aB | 3.38 | \pm | 0.29 | bA |
| Icatu | | 380 | 11.04 | \pm | 1.66 | aA | 10.22 | \pm | 0.96 | aA | 1.32 | \pm | 0.22 | bA | |
| | | 700 | 14.88 | \pm | 0.89 | aA | 10.97 | \pm | 1.70 | bA | 1.07 | \pm | 0.28 | cA | |
| IPR 108 | | 380 | 5.28 | \pm | 0.76 | aA | 0.62 | \pm | 0.21 | bA | 4.23 | \pm | 0.38 | aA | |
| | | 700 | 1.68 | \pm | 0.23 | aB | 1.92 | \pm | 0.28 | aA | 2.18 | \pm | 0.12 | aB | |
| GR ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1}$ g ⁻¹ DW) | | CL 153 | 380 | 0.790 | \pm | 0.110 | bA | 1.282 | \pm | 0.108 | aA | 0.794 | \pm | 0.088 | bA |
| | | | 700 | 0.435 | \pm | 0.056 | aA | 0.571 | \pm | 0.020 | aB | 0.455 | \pm | 0.054 | aA |
| | Icatu | 380 | 1.179 | \pm | 0.019 | bA | 1.816 | \pm | 0.221 | aA | 0.395 | \pm | 0.053 | cB | |
| | | 700 | 0.777 | \pm | 0.084 | bB | 1.019 | \pm | 0.118 | abB | 1.105 | \pm | 0.037 | aA | |
| | IPR 108 | 380 | 1.396 | \pm | 0.121 | aA | 0.696 | \pm | 0.112 | bA | 0.440 | \pm | 0.037 | bA | |
| | | 700 | 0.400 | \pm | 0.019 | aB | 0.478 | \pm | 0.032 | aA | 0.560 | \pm | 0.028 | aA | |
| | Catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 8.55 | \pm | 0.93 | bA | 12.42 | \pm | 0.85 | aA | 13.07 | \pm | 0.96 | aA |
| | | | 700 | 4.67 | \pm | 1.00 | bB | 10.49 | \pm | 1.30 | aA | 13.48 | \pm | 1.44 | aA |
| Icatu | | 380 | 7.62 | \pm | 1.47 | bA | 17.72 | \pm | 3.69 | aA | 5.37 | \pm | 1.27 | bB | |
| | | 700 | 5.67 | \pm | 1.19 | bA | 10.34 | \pm | 0.88 | aB | 12.77 | \pm | 0.54 | aA | |
| IPR 108 | | 380 | 17.87 | \pm | 1.15 | aA | 14.88 | \pm | 0.93 | aB | 13.57 | \pm | 1.16 | aB | |
| | | 700 | 13.09 | \pm | 0.69 | bB | 21.02 | \pm | 2.33 | aA | 23.80 | \pm | 0.43 | aA | |

With temperature rise to 37/30°C, enzyme activities changed differently with respect to genotype and [CO₂] conditions (Table 4). In CL153 380-plants, increases were found in APX, GR and CAT, whereas in the 700-plants only CAT activity was increased. In *lcatu*, increases in GR and CAT were observed under both CO₂ conditions, whereas some decrease was found in Cu,Zn-SOD and APX (the latter only in the 700-plants). In IPR108, different patterns were observed related to [CO₂], with activity increases in 700-plants (significantly for Cu,Zn-SOD and CAT), and decreases in 380-plants (non-significantly for CAT) in all enzymes.

Pronounced changes in enzyme activities were further noted when temperature increased from 37/30 to 42/34°C. In CL153 plants, regardless of [CO₂], Cu,Zn-SOD and GR activities remained invariant in parallel with an enhanced CAT activity (53% for 380 plants and 189% for 700-plants), whereas APX activity was remarkably reduced (46% and 66% in 380- and 700-plants, respectively). Within *C. arabica* genotypes, *lcatu* displayed reductions in APX (near to 10% of the initial value, irrespective of [CO₂]), GR and CAT (380-plants) and Cu,Zn-SOD (700-plants), in parallel with increases in both GR and CAT (700-plants) as well as in Cu,Zn-SOD (380-plants). In IPR108, the 700-plants showed increased activities of Cu,Zn-SOD (28%), APX (30%), GR (40%) and CAT, but only the activity of CAT varied significantly in response to [CO₂] treatments.

In summary, APX was the most negatively affected enzyme at the highest temperature (in CL153 and *lcatu*), CAT activity increased or remained invariant, whereas Cu,Zn-SOD was the less responsive enzyme to heat stress.

3.4 Other protective molecules

Ascorbate (ASC) content was similar between CO₂ conditions within each genotype under control temperature. However, *C. arabica* genotypes showed *ca.* threefold higher ASC contents than those in CL153 (Table 5). Overall, ASC pools were clearly reduced with increasing temperatures, beginning at 31/25°C for CL153 and IPR108 700-plants, and for *lcatu* 380-plants. Remarkable decreases were observed at the two highest temperatures, ranging from 69% (IPR108-700) to 86% (CL153-380), as compared with the control temperature.

Table 5 - Changes in the cellular content of the non-enzyme antioxidant molecules ascorbate and α -tocopherol, as well as HSP70 and the soluble sugars stachyose and, raffinose in *C. canephora* cv. Conilon (CL153) and *C. arabica* (Icatu and IPR108) plants, grown under 380 or 700 μLCO_2 L^{-1} , at control (25/20°C, day/night) and supra-optimal temperatures of 31/25°C, 37/30°C and 42/34°C. For each parameter, the mean values \pm SE (n=4-6) followed by different letters express significant differences between temperatures for the same CO_2 treatment, separately for each genotype (a, b, c, d), or between CO_2 treatments for each temperature, separately for each genotype (A, B).

| Compound | Genotype | [CO ₂] ($\mu\text{L L}^{-1}$) | Temperature (day/night) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------|--|-------------------------|-------------|-----|-------|-------------|-----|-------|-------------|---------|-------|-------------|-----|---------|-------------|-----|--|
| | | | 25/20°C | | | | 31/25°C | | | | 37/30°C | | | | 42/34°C | | | |
| Ascorbate (mg g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 0.316 | \pm 0.042 | aA | 0.341 | \pm 0.037 | aA | 0.070 | \pm 0.034 | bA | 0.044 | \pm 0.039 | bA | 0.044 | \pm 0.039 | bA | |
| | | 700 | 0.406 | \pm 0.037 | aA | 0.158 | \pm 0.037 | bB | 0.064 | \pm 0.042 | bA | 0.069 | \pm 0.042 | bA | 0.069 | \pm 0.042 | bA | |
| | Icatu | 380 | 0.994 | \pm 0.117 | aA | 0.430 | \pm 0.104 | bB | 0.660 | \pm 0.117 | abA | 0.248 | \pm 0.135 | bA | 0.248 | \pm 0.135 | bA | |
| | | 700 | 1.136 | \pm 0.135 | aA | 0.900 | \pm 0.104 | abA | 0.453 | \pm 0.135 | bcA | 0.224 | \pm 0.125 | cA | 0.224 | \pm 0.125 | cA | |
| | IPR 108 | 380 | 1.288 | \pm 0.089 | aA | 1.248 | \pm 0.089 | aA | 0.800 | \pm 0.079 | bA | 0.347 | \pm 0.103 | cA | 0.347 | \pm 0.103 | cA | |
| | | 700 | 1.205 | \pm 0.103 | aA | 0.545 | \pm 0.089 | bcB | 0.761 | \pm 0.103 | bA | 0.374 | \pm 0.103 | cA | 0.374 | \pm 0.103 | cA | |
| α -Tocopherol (mg g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 0.729 | \pm 0.035 | aA | 0.659 | \pm 0.043 | abA | 0.403 | \pm 0.043 | cA | 0.565 | \pm 0.043 | bcA | 0.565 | \pm 0.043 | bcA | |
| | | 700 | 0.414 | \pm 0.043 | bcB | 0.583 | \pm 0.043 | aA | 0.271 | \pm 0.043 | cB | 0.503 | \pm 0.043 | abA | 0.503 | \pm 0.043 | abA | |
| | Icatu | 380 | 0.284 | \pm 0.036 | cA | 0.341 | \pm 0.036 | bcA | 0.458 | \pm 0.036 | bA | 1.013 | \pm 0.036 | aA | 1.013 | \pm 0.036 | aA | |
| | | 700 | 0.379 | \pm 0.036 | bcA | 0.338 | \pm 0.036 | cA | 0.489 | \pm 0.029 | bA | 0.716 | \pm 0.036 | aB | 0.716 | \pm 0.036 | aB | |
| | IPR 108 | 380 | 0.373 | \pm 0.017 | cA | 0.494 | \pm 0.017 | bA | 0.473 | \pm 0.017 | bA | 0.813 | \pm 0.017 | aA | 0.813 | \pm 0.017 | aA | |
| | | 700 | 0.206 | \pm 0.017 | dB | 0.337 | \pm 0.017 | cB | 0.502 | \pm 0.017 | bA | 0.578 | \pm 0.017 | aB | 0.578 | \pm 0.017 | aB | |
| HSP70 ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) | CL 153 | 380 | 0.667 | \pm 0.087 | cB | 2.051 | \pm 0.019 | aA | 1.771 | \pm 0.028 | bA | 0.812 | \pm 0.014 | cA | 0.812 | \pm 0.014 | cA | |
| | | 700 | 0.994 | \pm 0.035 | bA | 1.533 | \pm 0.040 | aB | 1.609 | \pm 0.046 | aA | 0.861 | \pm 0.011 | bA | 0.861 | \pm 0.011 | bA | |
| | Icatu | 380 | 0.818 | \pm 0.047 | bA | 1.810 | \pm 0.041 | aA | 1.699 | \pm 0.047 | aB | 1.897 | \pm 0.060 | aA | 1.897 | \pm 0.060 | aA | |
| | | 700 | 0.710 | \pm 0.040 | cA | 1.771 | \pm 0.049 | bA | 3.264 | \pm 0.084 | aA | 1.774 | \pm 0.056 | bA | 1.774 | \pm 0.056 | bA | |
| | IPR 108 | 380 | 1.001 | \pm 0.017 | cA | 1.635 | \pm 0.060 | bB | 1.868 | \pm 0.012 | aA | 1.616 | \pm 0.036 | bB | 1.616 | \pm 0.036 | bB | |
| | | 700 | 0.830 | \pm 0.047 | cA | 1.877 | \pm 0.021 | aA | 1.558 | \pm 0.038 | bB | 1.960 | \pm 0.048 | aA | 1.960 | \pm 0.048 | aA | |
| Stachyose (mg g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 1.85 | \pm 0.06 | aA | 2.05 | \pm 0.09 | aA | 1.41 | \pm 0.02 | bA | 0.65 | \pm 0.06 | cB | 0.65 | \pm 0.06 | cB | |
| | | 700 | 0.79 | \pm 0.06 | dB | 1.74 | \pm 0.09 | aB | 1.43 | \pm 0.02 | bA | 1.13 | \pm 0.06 | cA | 1.13 | \pm 0.06 | cA | |
| | Icatu | 380 | 1.04 | \pm 0.07 | bA | 0.44 | \pm 0.01 | cA | 1.09 | \pm 0.05 | abA | 1.22 | \pm 0.04 | aA | 1.22 | \pm 0.04 | aA | |
| | | 700 | 0.39 | \pm 0.01 | cB | 0.32 | \pm 0.01 | cA | 0.75 | \pm 0.03 | bB | 1.34 | \pm 0.03 | aA | 1.34 | \pm 0.03 | aA | |
| | IPR 108 | 380 | 1.17 | \pm 0.02 | cA | 1.37 | \pm 0.04 | bcA | 1.52 | \pm 0.03 | bA | 2.04 | \pm 0.20 | aA | 2.04 | \pm 0.20 | aA | |
| | | 700 | 0.61 | \pm 0.04 | bB | 0.67 | \pm 0.04 | bB | 1.11 | \pm 0.01 | aB | 0.98 | \pm 0.02 | abB | 0.98 | \pm 0.02 | abB | |
| Raffinose (mg g ⁻¹ DW) | CL 153 | 380 | 3.54 | \pm 0.12 | abA | 2.14 | \pm 0.20 | cA | 2.64 | \pm 0.36 | bcB | 4.53 | \pm 0.21 | aA | 4.53 | \pm 0.21 | aA | |
| | | 700 | 3.65 | \pm 0.12 | abA | 2.71 | \pm 0.20 | bA | 3.93 | \pm 0.36 | aA | 4.69 | \pm 0.21 | aA | 4.69 | \pm 0.21 | aA | |
| | Icatu | 380 | 4.06 | \pm 0.13 | bA | 4.54 | \pm 0.44 | bA | 10.71 | \pm 0.09 | aA | 11.07 | \pm 0.22 | aB | 11.07 | \pm 0.22 | aB | |
| | | 700 | 3.62 | \pm 0.18 | dA | 5.02 | \pm 0.44 | cA | 8.84 | \pm 0.29 | bB | 13.14 | \pm 0.15 | aA | 13.14 | \pm 0.15 | aA | |
| | IPR 108 | 380 | 4.98 | \pm 0.08 | dA | 7.32 | \pm 0.35 | cA | 11.20 | \pm 0.28 | bA | 15.18 | \pm 0.73 | aA | 15.18 | \pm 0.73 | aA | |
| | | 700 | 5.11 | \pm 0.10 | cA | 5.66 | \pm 0.35 | cB | 7.49 | \pm 0.14 | bB | 12.94 | \pm 0.18 | aB | 12.94 | \pm 0.18 | aB | |

α -tocopherol (TOC) showed different trends between the two coffee species. Despite some fluctuations with rising temperatures, at 42/34°C TOC pools changed moderately in CL153 irrespective of [CO₂], with a 22% decrease in 380-plants and a 21% rise in 700-plants. In contrast, at 42/34°C and under both CO₂ conditions, TOC pools increased in Icatu and IPR108, ranging from 89% (Icatu-700) to 257% (Icatu-380), with 380-plants presenting the highest contents.

At 25/20°C the 700-plants showed similar (raffinose) or lower (stachyose) contents of RFOs than their 380-plant counterparts. Temperature rise prompted modifications in RFOs, with no clear relation with the [CO₂] treatments. In CL153, significant increases were observed only for stachyose in the 700-plants from 31/25°C onwards. On the other hand, at 42/34°C, both stachyose and raffinose displayed greater contents in *C. arabica* plants, when compared to 25/20°C, particularly raffinose whose contents increased between 153% (IPR108-700) and 263% (Icatu-700). Also, in IPR108, both RFOs content were always higher in the 380-plants at supra-optimal temperatures.

The constitutive cell HSP70 pools (25/20°C) were similar between [CO₂] in *C. arabica* genotypes, but presented a higher value in CL153 700-plants. Rising temperature clearly promoted HSP70 accumulation: significantly higher HSP70 contents were already observed at 31/25°C in all genotypes, which were mostly maintained until 42/34°C (*C. arabica* plants) or until 37/30°C in CL153 (decreasing afterwards). In all genotypes, maximal HSP70 contents, relative to control temperature, were observed in CL153-380 at 31/25°C (208%), and in the 700-plants of Icatu at 37/30°C (360%) and IPR108 at 42/34°C (136%).

3.5 Expression of genes with a potential role in heat acclimation

Several changes in gene expression patterns were imposed by enhanced [CO₂] and temperature (Table 6). At 25/20°C, the expression of genes coding for the protective proteins *HSP70*, *ELIP*, *Chape 20* and *Chape 60* was similar or lower in the 700-plants compared with their 380-plant counterparts in all genotypes. With rising temperature a global gene upregulation was observed (maximal at 42/34°C) in all genotypes and both [CO₂], although stronger in the 700-plants of Icatu and CL153 and 380-plants of IPR.

Table 6 - Real-time PCR expression studies relative to the expression value observed under control conditions of temperature and CO₂ (25/20°C, 380 µL CO₂ L⁻¹), within each genotype from leaves of *C. canephora* cv. Conilon (CL153) and *C. arabica* (Icatu and IPR108) plants, grown under 380 or 700 µLCO₂ L⁻¹, at control (25/20°C, day/night) and supra-optimal temperatures of 31/25°C, 37/30°C and 42/34°C. It were studied genes of the 70 kDa heat shock-related protein from chloroplastic stroma (*HSP70*), early light-induced protein (*ELIP*), 20 kDa chaperonin from chloroplast (*Chape 20*), Chaperonin CPN60 (*Chape 60*), all related to protective proteins; the genes of catalase isozyme 1 (*CAT*), Cu,Zn superoxide dismutases (*CuSOD1* and *CuSOD2*), Fe-superoxide dismutase from chloroplast (*FeSOD*), ascorbate peroxidase from cytoplasm (*APX Cyt*) and chloroplast (*APX Chl*), all related to antioxidative enzymes; and probable tocopherol O-methyltransferase from chloroplast (*Toc Mt*) and tocopherol cyclase from chloroplast (*Toc Cy*) related to the tocopherol synthesis pathway. The gene expression values represent n fold relative to the control of temperature and [CO₂] (25/20°C – 380 µL CO₂ L⁻¹) within each genotype. Original expression values for each gene resulted from the mean ± SE (n=6-9), from 3 independent biological assays. * indicate the presence of statistical significance.

| Gene Expression Relative to Control Temperature and CO ₂ (25/20°C, 380 µL L ⁻¹) | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------|--|--------------|-------------|-----------------|-----------------|------------|---------------|---------------|--------------|----------------|----------------|---------------|----------------|-------|
| Genotype | Temperature (day/night) | [CO ₂] (µL L ⁻¹) | <i>HSP70</i> | <i>ELIP</i> | <i>Chape 20</i> | <i>Chape 60</i> | <i>CAT</i> | <i>CuSOD1</i> | <i>CuSOD2</i> | <i>FeSOD</i> | <i>APX Cyt</i> | <i>APX Chl</i> | <i>TOC Mt</i> | <i>TOC Cyt</i> | |
| CL 153 | 25/20°C | 380 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | |
| | | 700 | 0.53 | 0.68 | 1.28 | 0.24 | 0.85 | 0.16 | 0.49 | 1.64 | 7.53 | 1.17 | 0.84 | 0.17 | |
| | 31/25°C | 380 | 0.60 | 1.82 | 3.56* | 0.52 | 1.70 | 0.02* | 0.61 | 1.14 | 3.26 | 1.18 | 0.06* | 0.35 | |
| | | 700 | 0.64 | 1.35 | 0.63 | 0.37 | 1.36 | 0.15 | 0.56 | 0.59 | 2.71 | 1.07 | 0.29 | 0.18 | |
| | 37/30 °C | 380 | 1.93 | 3.33 | 7.48* | 1.14 | 1.73 | 0.02* | 1.10 | 0.94 | 39.96* | 1.35 | 0.09 | 0.24 | |
| | | 700 | 2.37 | 6.77 | 3.76 | 1.53 | 1.64 | 0.16 | 1.10 | 1.29 | 81.88* | 3.21 | 0.95 | 0.36 | |
| | 42/34°C | 380 | 7.39 | 8.30 | 16.64* | 6.24 | 2.37* | 0.08 | 3.32 | 1.28 | 251.02* | 4.44 | 0.39 | 0.43 | |
| | | 700 | 59.04* | 54.57* | 145.31* | 33.14* | 10.02* | 0.59 | 24.26* | 5.18 | 1,761.06* | 9.59* | 2.67 | 2.30 | |
| | Icatu | 25/20°C | 380 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| | | | 700 | 0.63 | 1.67 | 0.81 | 0.75 | 2.05* | 0.46 | 0.80 | 0.75 | 0.85 | 1.36 | 0.87 | 0.78 |
| 31/25°C | | 380 | 0.95 | 2.33 | 1.93 | 1.18 | 1.88* | 0.29* | 1.00 | 0.39* | 0.46* | 0.72 | 0.46* | 0.98 | |
| | | 700 | 0.87 | 2.70 | 1.74 | 1.32 | 1.88* | 0.19* | 0.95 | 0.48* | 1.15 | 0.91 | 0.47 | 1.12 | |
| 37/30 °C | | 380 | 2.70* | 4.71* | 4.00* | 2.83* | 1.84* | 0.19* | 1.39* | 0.59* | 0.50 | 0.71 | 0.44 | 0.74 | |
| | | 700 | 2.74 | 7.38 | 3.29* | 3.42 | 2.86* | 0.13* | 2.13* | 0.77 | 1.57 | 2.87 | 0.22* | 1.65 | |
| 42/34°C | | 380 | 4.96* | 9.28* | 7.40* | 14.63* | 1.75* | 0.07* | 2.88* | 0.47* | 7.94* | 1.48 | 1.31 | 1.40 | |
| | | 700 | 9.36* | 12.16* | 13.52* | 34.19* | 1.28 | 0.15* | 3.75* | 0.49 | 24.49* | 5.04* | 0.62 | 1.57 | |
| IPR 108 | | 25/20°C | 380 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| | | | 700 | 0.37* | 1.41 | 0.36* | 0.27* | 1.66* | 0.19* | 0.58* | 0.44* | 0.27* | 0.23* | 0.49 | 0.28* |
| | 31/25°C | 380 | 0.40 | 1.62* | 1.07 | 0.78 | 1.55 | 0.57 | 0.94 | 0.47* | 0.90 | 0.93 | 0.59 | 0.85 | |
| | | 700 | 0.50* | 1.24 | 0.82 | 1.36 | 2.89* | 0.66 | 1.17 | 0.54* | 0.42* | 0.23* | 0.25* | 0.33* | |
| | 37/30 °C | 380 | 2.03* | 6.51* | 4.18* | 3.08* | 2.03* | 4.13* | 0.79 | 0.44* | 0.55 | 1.26 | 0.89 | 0.77 | |
| | | 700 | 1.07 | 3.13 | 1.30 | 1.86 | 0.97 | 0.57 | 1.12 | 0.30* | 0.14* | 0.35 | 0.21* | 0.25* | |
| | 42/34°C | 380 | 4.53* | 11.23* | 9.85* | 20.83* | 1.67 | 0.06 | 1.98* | 0.49* | 17.37* | 1.40 | 0.66 | 1.00 | |
| | | 700 | 1.79 | 4.18 | 4.12* | 4.25 | 0.64 | 0.96 | 0.85 | 0.26 | 2.73 | 0.61 | 0.03* | 0.24* | |

Notably, CL153 700-plants showed the highest increases: ca. 33- (*Chape 60*), 55- (*ELIP*), 59- (*HSP70*) and 145- (*Chape 20*) fold. Overall, the expression patterns of genes related to antioxidative system components (*CAT*, *SOD*, *APX* and *TOC*) tended to be lower in the 700-plants than in the 380-plants at the control temperature, mainly in the two *C. arabica* genotypes (except for *CAT*). Under rising temperatures *CAT* expression increased moderately (below 3-fold) in most cases, and more markedly in CL153 700-plants (10-fold). The *APX* transcripts (particularly *APX Cyt*) increased with heat, with maximal abundance at 42/34°C, especially in Icatu and CL153 700-plants. In fact, the *APX Cyt* upregulation in CL153-700 (1760 fold) was, by far, the largest observed over the entire experiment for all studied genes. In contrast, *CuSOD1* and *FeSOD* genes were mainly downregulated by temperature in all genotypes. Among the genes coding for SOD enzymes, only *CuSOD2* was significantly upregulated at the two highest temperatures in both [CO₂] in Icatu, and at 42/34°C in CL153-700 and IPR-380 plants. *TOC* genes were mainly downregulated (except CL153 700-plants). Notably, IPR108 had the strongest global downregulation for the genes related to the antioxidative system, with the exception of *APX Cyt* at 42/34°C in 380-plants.

4. Discussion

4.1 PSII photoinhibition in face of high CO₂ and temperature

The balance of energy use and/or dissipation capabilities, herein analysed using the dynamic (PI_{Dyn}) and chronic (PI_{Chr}) PSII photoinhibition estimates (Fig. 1A, B), remained nearly invariant until 37/30°C, a temperature that is considered well above the optimum for both *C. arabica* and *C. canephora* (DaMATTA and Ramalho, 2006). These results evidence a considerable heat tolerance of the coffee's photosynthetic machinery until 37/30°C, which is accompanied by the maintenance of photochemical energy use (Rodrigues et al., 2016). In fact, photochemical components and RuBisCO activity were strengthened (especially under high [CO₂]), in contrast to what is often observed in other species even at moderately high temperature (e.g., Haldimann and Feller, 2004). In sharp contrast, increases in both PI_{Chr} (and PI_{Total}) were evident at 42/34°C (Fig. 1B, C) in 380-plants, particularly in Icatu. This reflected a mitigatory impact of elevated

[CO₂] on the photochemical functioning, in line with the lower rate constant for PSII inactivation (F_s/F_m') and non-photochemical quenching attributable to photo-inactivation and non-regulated energy dissipation in PSII ($Y_{(NO)}$) observed in 700 plants at 42/34°C (Rodrigues et al., 2016). Taking all of this information together, it is clear that tolerance to heat stress was compromised at 42/34°C at normal [CO₂], whereas at elevated [CO₂] a mitigating effect against heat impacts was evident in this study. Similar findings have been reported in other species, where elevated [CO₂] has been shown to preserve the photosynthetic functioning, as in the Mediterranean cork oak (*Quercus suber*) under the exposure to supra-optimal temperatures (Faria et al., 1996).

4.2 Triggering heat-protective mechanisms under enhanced [CO₂]

Thermotolerance frequently involves the triggering of cellular mechanisms that prevent oxidative damage, interlinking temperature stress and a balance between ROS signalling and control (Suzuki and Mittler, 2006; Hasanuzzaman et al., 2013). In addition, the strengthening of antioxidative mechanisms has proven to be decisive to stress acclimation in *Coffea* spp., namely, to cold, high irradiance, drought and nitrogen starvation (Ramalho et al., 1998; Fortunato et al., 2010; Batista-Santos et al., 2011; Cavatte et al., 2012; Ramalho et al., 2014). Therefore, under enhanced [CO₂], robust thermal protective mechanisms are expected, supporting an unaltered photosynthetic functioning up to 37/30°C in addition to maintaining a better metabolic performance even at 42/34°C, when compared to normal [CO₂], as reported previously (Rodrigues et al., 2016).

4.2.1 Pigment dynamics

Carotenoids act as thermal quenchers and scavengers of highly reactive species of Chl and O₂. Under control temperature, the high [CO₂] prompted a tendency to higher carotenoid contents in CL153. This contrasted with a reduction trend in photoprotective carotenoids (VAZ pool, lutein, carotenes) in *C. arabica* genotypes, similarly to what has been found in other species, where a relaxation of the antioxidant system was associated with a higher C-assimilation that ultimately led to a reduced energy load on the photosynthetic apparatus (Erice et al., 2007).

Under supra-optimal temperatures, decreases of most carotenoids were found in the 700-plants of CL153 (and IPR108 until 37/30°C), when compared to their respective 380-plants. In contrast, *C. arabica* genotypes showed increased total Chl and total Car contents regardless of [CO₂], suggesting a photosynthetic structures strengthening at 37/30°C (and even at 42/34°C in some cases) driven by temperature. Increases in total Car resulted mostly from the moderate Z increases and the strong rises in lutein and β-carotene that have complementary actions, decreasing the formation of highly reactive species of Chl and oxygen, preventing PSs and membrane photodamage, and protecting the Cyt b₆/f complex from photobleaching promoted by ¹O₂ (Zhang et al., 1999). Z protects LHCs from both PSs by controlling ³Chl* and ¹Chl* formation and by removing epoxy groups from the oxidised double bonds from the lipid phase of thylakoid fatty acids, whereas β-carotene and lutein-epoxide cycle (and neoxanthin) quenches ³Chl* and ¹O₂, which are lipoperoxidation initiators (Lichtenthaler and Babani, 2004; Logan, 2005; Kalituho et al., 2007, Matsubara et al., 2011). In addition, neoxanthin maintenance and lutein increase might improve antennae functionality given that these xanthophylls are integral components of the peripheral LHC and are important for its trimeric assembly, stability and efficiency (Kalituho et al., 2007; Matsubara et al., 2011). These functions agree with the maintenance of PSI and PSII activities in *C. arabica* genotypes until 37/30°C (Rodrigues et al., 2016). Nevertheless, at 42/34°C PSII photoinhibition was evident in 380-plants (Fig. 1), when pigments (except lutein) tended to lower values (Table 2) when compared with those observed at 37/30°C. Therefore, changes in photoprotective pigments were not strong enough to protect the PSs in the three genotypes, especially in lcatu, which was the most affected genotype by heat stress. However, the lower photoinhibition status in the 700-plants at 42/34°C (Fig. 1) was not accompanied by clear increases in the pools of photoprotective pigments, suggesting that these molecules are not the only ones accounting for the better preservation of photosynthetic activity under heat stress at elevated [CO₂].

Chl-to-Car ratio was quite stable along the experiment in CL153, and until 37/30°C in *C. arabica* plants (Table 3). This pattern was independent from [CO₂], as also observed in other woody species (Bader et al., 2010). Chl (*a/b*) ratio

showed similar values between [CO₂], but decreased in all genotypes at the two highest temperatures, especially at 42/34°C. Since net degradation of Chls was apparently absent, this Chl (*a/b*) reduction reflected preferential Chl *b* synthesis, suggesting functional readjustments with a higher proportion of light harvesting chlorophyll-protein complex from PSII (LHCII), which contains the majority of Chl *b* (with a Chl *a/b* ratio around 1.1 to 1.3) (Lichtenthaler and Babani, 2004). Nonetheless, it should not be ruled out that decreases in Chl (*a/b*) might reflect some heat susceptibility given that this ratio has been shown to increase in heat-tolerant genotypes of other species (Bita and Gerats, 2013).

4.2.2 Antioxidative enzymes

The ascorbate-glutathione cycle is a vital mechanism to control cell oxidative stress, and include both enzyme (e.g., Cu,Zn-SOD, APX, GR, among others) and non-enzyme (ASC, GSH) components, which altogether scavenge several ROS (O₂^{•-}, H₂O₂, OH[•]) (Asada, 1994; Foyer, 2002, Smirnoff, 2005). With the exception of Cu,Zn-SOD in CL153 and Icatu, 700-plants showed a somewhat downregulation of the antioxidative enzymatic system at control temperature. Such lower constitutive level of antioxidative capability under high [CO₂] has been interpreted in other species as compromising the plant's ability to cope with sudden stress events (Pritchard et al., 2000). However, in coffee plants, this may be associated with higher photosynthetic rates (Rodrigues et al., 2016), which concomitantly with the inhibition of photorespiration under elevated CO₂ (DaMATTA et al., 2016), is believed to decrease the excitation pressure in the PSs and avoid ROS formation, thus ultimately precluding the need of developing a robust antioxidant system. In fact, although elevated CO₂ may lead to decreases in SOD, APX, GR, and CAT activities (Pritchard et al., 2000; Erice et al., 2007; Vurro et al., 2009), even under supra-optimal temperatures (Erice et al., 2007; AbdElgawad et al., 2015), a concomitant reduction in the lipoperoxidation status has been often observed. Taken together, this information supports the notion that reduced ROS production under high CO₂ conditions in C₃ plants is indeed related to a higher photosynthetic functioning and inhibition of photorespiration (Erice et al., 2007; Vurro et al., 2009; AbdElgawad et al., 2015), as would also be the case in coffee plants at control temperature.

With rising temperatures thermotolerance can be improved by increasing transcript and protein levels of ROS-scavenging enzymes (Suzuki and Mittler, 2006; Hasanuzzaman et al., 2013), which agrees with the increases in APX, GR and CAT in CL153-380, GR and CAT in Icatu (both CO₂ conditions), and Cu,Zn-SOD and CAT in IPR108 700-plants. In addition, in line with the observed heat tolerance until 37/30°C the 380-plants from Icatu presented similar (Cu,Zn-SOD and APX) or higher (GR and CAT) activities than their 700-plants counterparts, compensating for the lower photosynthetic rates. Similarly, the IPR108 380-plants presented higher (Cu,Zn-SOD and CAT) or similar (GR and APX) enzyme activities than their respective 700-plants. Irrespective of genotypes and [CO₂], FeSOD gene was not significantly upregulated under supra-optimal temperatures, and therefore O₂^{•-} removal through extra chloroplast SOD action is not expected to be reinforced.

The additional temperature increase to 42/34°C led to further changes in enzyme activities with varying genotypic patterns. In CL153 plants only APX activity was reduced (despite the *APX Chl* upregulation), but the H₂O₂ control might have been achieved in extra-chloroplast compartments in good agreement with both increases in CAT activity in both [CO₂] and upregulation of *CAT* and *APX Cyt* genes (especially in the 700-plants) (Table 6). This responsiveness to H₂O₂ control, together with the stability in Cu,Zn-SOD and GR, could have alleviated heat stress in these plants by maintaining redox homeostasis (Li et al., 2014) and minimizing the heat-induced oxidative impairments to the photosynthetic apparatus (Fig. 1; Rodrigues et al., 2016). These responses are in line with the well-known better heat tolerance of *C. canephora* (DaMATTA and Ramalho, 2006). On the other hand, Icatu 380-plants showed reductions in the activity of all enzymes (except Cu,Zn-SOD), likely contributing to the strongest decrease in photosynthetic performance (Rodrigues et al., 2016) and highest photoinhibition status (Fig. 1) relative to the other genotypes. Furthermore, in Icatu 380-plants the increase in Cu,Zn-SOD, but not in APX and CAT activities, might have limited an integrated H₂O₂ scavenging (Fortunato et al., 2010). Compared with Icatu 380-plants, their 700-counterparts (despite showing decreased APX activity) displayed a strong upregulation of GR and CAT activities, as well as *APX Cyt* (and *APX Chl*) gene expression at 42/34°C, which

may have contributed to a lower impact on the photosynthetic performance in elevated [CO₂]. At the two highest temperatures, the scavenging capability in IPR108 700-plants was not stronger than that of 380-plants (with the exception related to CAT activity), and a lower gene expression for the antioxidant enzymes and other protective proteins (HSP70, ELIP, Chape 20 and 60) was observed. Therefore, a better ROS control could be mostly prompted by the higher rates of electrons driven to C-assimilation, as also reported in grapevine (*Vitis vinifera*) under high [CO₂] and increased temperature (Salazar-Parra et al., 2012).

Chloroplastic APX was the most affected enzyme at 42/34°C, contrasting to the large increase in *APX Cyt* expression, which was the most responsive gene to high temperature (in CL153). Since CAT was the only enzyme to present significant increased activities in the three genotypes in the 700-plants (and also in CL153 380-plants), this suggested a drift of H₂O₂ control from chloroplast APX to extra-chloroplast CAT (predominantly located in peroxisomes, glyoxissomes and mitochondria) and possibly cytosolic APX. In fact, since H₂O₂ is capable of diffusing passively across membranes, extrachloroplastic scavenging systems are important H₂O₂ detoxification pathways (Feierabend, 2005; Logan, 2005).

4.2.3 Other protective molecules

ROS control can be complemented by ASC, TOC, HSPs and other cellular protectants under stressful conditions (Suzuki and Mittler, 2006). The changes found in other protective molecules were mostly promoted by temperature rather than by enhanced [CO₂] *per se*. This was the case of ASC, which decreased significantly with supra-optimal temperatures in all genotypes, which could have been promoted by TOC accumulation (Kanwischer et al., 2005) in *C. arabica* plants. At the highest temperature, ASC reductions were in line with losses in APX activity, as observed in CL153 and Icatu. Similar results have also been reported in other species (Erice et al., 2007). In fact, ASC reacts with H₂O₂ in a reaction catalysed by APX, as well as non-enzymatically with ¹O₂, O₂ •⁻, OH • and lipid hydroperoxides (Asada, 1994; Foyer, 2002; Logan, 2005). Given that ASC is also a substrate for V de-epoxidase to synthesize Z from V (Logan 2005; Smirnoff 2005), decreases in ASC pools might also have limited Z synthesis, thus ultimately resulting in a modest DEPS value (Table 2) under heat stress.

In plants, TOC pools are confined to chloroplasts (Munné-Bosch, 2005). Therefore, the remarkable increase of this lipophilic antioxidant under heat stress in *C. arabica*, especially in the 380-plants at 42/24°C, clearly reflected a positive stress response at chloroplast level, given that TOC deactivates $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet , limits lipid peroxidation by reducing lipid peroxy radicals, and stabilizes membrane structures due to its interactions with polyunsaturated fatty acyl chains (Munné-Bosch, 2005; Smirnov, 2005). This action was further reinforced by the presence of high β -carotene (Table 2) in *C. arabica* genotypes (mostly in Icatu) that co-operate in limiting $^1\text{O}_2$ damages (Munné-Bosch, 2005) and regenerating carotenoid radicals produced with the reaction of carotenoid with lipid peroxy radicals (Smirnov, 2005). This TOC increase contrasted with an absence of upregulation of *TOC My* and *TOC Cyt* genes (genes coding for enzymes that catalyse the last two steps of TOC synthesis) in *C. arabica* plants regardless of $[\text{CO}_2]$. However, this apparent discrepancy may be related to the observation that these final steps might be not limiting to TOC synthesis (Kanwischer et al., 2005).

The RFOs pathway is highly adjustable in plant stress response. The only RFOs detected in coffee leaves, stachyose and raffinose, increased at the two highest temperatures. RFOs typically accumulate under environmental stresses (Sicher, 2013), having membrane protective roles (including the maintenance of thylakoid electron transport) against temperature, drought and ROS impairments (Santarius, 1973; Santos et al., 2011; Sicher, 2013). Therefore, their increases were consistent with the preservation of thylakoid electron transport involving both photosystems capabilities in coffee (Rodrigues et al., 2016). Nevertheless, in IPR108, despite the buildup in stachyose and raffinose contents promoted by high temperature, it seems noteworthy that high $[\text{CO}_2]$ plants maintained significantly lower values than 380-plants. Assuming that these leaf metabolites accumulation was related to activation of stress related genes, a lower buildup under heat stress conditions could point that CO_2 enrichment was able to mitigate this process, as suggested to occur in soybean leaflets, where high temperature promoted raffinose increase under ambient CO_2 , but not under high $[\text{CO}_2]$ (Sicher, 2013).

Plants evolved also molecular chaperones as stress defences. These are a group of functional proteins with key roles in protein protection in both optimal and adverse conditions (Wang et al., 2004), including HSPs that are related to thermal acclimation. HSP70 prevents proteins of different metabolic pathways from denaturation and aggregation, helping in folding, refolding and assembly, as well as in translocation processes and in facilitating the proteolytic degradation of unstable proteins (Wang et al., 2004; Fragkostefanakis et al., 2015). In coffee plants HSP70 content was not constitutively buildup by high [CO₂], similar to the findings of Bokhari et al. (2007) in rice, accompanied by a downregulation tendency of HSP70 gene at 25/20°C in the 700-plants relative to the 380-ones. However, HSP70 synthesis was one of the earlier responses to rising temperature, from 31/25 upwards. Although some *HSP70* downregulation occurred under high CO₂ at control temperature, increased transcriptional levels were found at the two highest temperatures for all genotypes. Furthermore, although this response was not clearly related to high CO₂, higher HSP70 gene upregulation were observed in 700-plants of CL153 and Icatu at 42/34°C. Similar strong and fast transcriptional activation has been considered essential for protein homeostasis and a requisite for development and survival under stress (Fragkostefanakis et al., 2015). HSP70 can also be involved in the protection and repair of PSII (Schroda et al., 1999) in addition to having a pivotal role in the upregulation of enzymatic antioxidant defences, under single or combined drought and heat stresses, thereby indirectly helping ROS control (Hu et al., 2010). Therefore, HSP70 increases might have contributed to preserve PSII functioning at supra-optimal temperatures (Fig. 1; Rodrigues et al., 2016) until 37/30°C for both [CO₂], and to stimulate GR and CAT activities at 42/34°C (700-plants) (Table 4).

Concerning other protective molecules, the gene expression of chaperonins 20 and 60 (*Chape 20* and *60*) and early light-induced protein (*ELIP*) from the chloroplast was also examined (Table 6). As for HSP70, while significant changes in *Chape 20* and *60* showed a clear upregulation under elevated CO₂ at 42/34°C (in CL153 and Icatu), under control temperature the expression did not significantly change, or even tend to decrease, with CO₂ enrichment, as also observed by Vicente et al. (2015) in durum wheat. In this study, a 4°C increase

further downregulated *Chape 60* transcription, especially under low N-availability. However, both chaperonin 20 and 60 have been associated with enhancement of stress tolerance as they play a crucial role by assisting a wide range of newly synthesized and newly translocated proteins to achieve their native forms, namely RuBisCO (see Wang et al., 2004). Furthermore, chaperonin 60 is also involved in the assembly of chloroplast ATP synthase (Mao et al., 2015). Therefore, the strong upregulation *Chape 20* and *Chape 60* at the two highest temperatures, especially in 700-plants of CL153 and Icatu, could help to maintain ATP synthesis coupled to thylakoid electron transport, a lower PSII inactivation and higher photosynthetic potential, as observed at 42/24°C in these plants (Rodrigues et al., 2016).

The ELIP family members are nuclear-encoded photoprotective proteins that accumulate in thylakoid membranes in response to various abiotic stresses. They prevent free radical formation and participate in energy dissipation (Adamska, 2001). Indeed a strong relation between tolerance to photooxidation and ELIPs level has been reported (Hutin et al., 2003). Thus, the stronger *ELIP* upregulation on the 700-plants of CL153 and Icatu might have played a role in preserving thylakoid functions (Rodrigues et al., 2016), thus avoiding photoinhibition (Fig. 1).

5. Conclusions

Relevant heat tolerance up to 37/30°C for both [CO₂] and all coffee genotypes was observed, largely supported by the maintenance or increase of the pools of several protective molecules (neoxanthin, lutein, carotenes, TOC, HSP70, raffinose), by the activities of antioxidant enzymes (SOD, APX, QR, CAT), and by the upregulated expression of some genes (*ELIP*, *Chape 20*). Nevertheless, *C. arabica* plants seemed to be more responsive, although improved photosynthetic activity was promoted under high [CO₂] in all genotypes (Rodrigues et al., 2016). However, at 42/34°C photosynthesis photoinhibition was manifested, especially in the 380-plants and in Icatu. At this temperature a global reinforcement of the antioxidative system was not observed, but gene upregulation of protective mechanisms (*HSP70*, chaperonins, *ELIP* and *APX*

Cyt), as well as raffinose content, constituted a common heat defence line in all genotypes. A consistently higher expression was observed in CL153 at the highest temperature, in agreement with its better tolerance to elevated temperatures. TOC and HSP70 seemed to be particularly relevant in *C. arabica* genotypes. The presence of RFOs, lutein, β -carotene, TOC and HSP70, as well as the upregulated expression of genes related to protective proteins (*ELIPS*, *HSP70*, *Chape 20* and *60*) and antioxidant enzymes (*CAT*, *CuSOD2*, *APX Cyt*, *APX Chl*), which should act in concert to control ROS formation and scavenging, were mostly driven by temperature increase. Nevertheless it was noteworthy that the plants grown under enhanced [CO₂] maintained higher activities of GR (Icatu), CAT (Icatu and IPR) and kept (or even increased) the activities of Cu,Zn-SOD, APX and CAT. These differences between [CO₂] were particularly clear in Icatu, with the 380-plants suffering from the greatest photosynthetic impact amongst the genotypes. Furthermore, the strongest upregulation of genes related to protective proteins found in the 700-plants of CL153 and Icatu likely contributed to strengthen their ability to maintain higher functional levels. The simultaneous gene upregulation of antioxidative enzymes and molecular chaperones at the two highest temperatures fully agrees with the known pivotal protective roles of these proteins, as well as to the observed cross-talk between HSPs/chaperones and other stress response mechanisms under abiotic stress conditions (Wang et al., 2004).

Notably, our data also suggest a drift of H₂O₂ control from chloroplast (APX) to extra-chloroplast (CAT) taking into account the increases in CAT activities in all 700-plants (and CL153 380-plants) coupled with strong decreases in APX activity. The 700-plants showed higher photochemical energy use ability, which should constitute the major sink for electron transport, preventing electrons to react with O₂ to produce ROS. Therefore, this should be perceived as a first line of defence against excessive energy load, constituting a primary mean of protection against oxidative conditions and photoinhibition, allowing acclimation to take place.

Overall, our results showed that high [CO₂] mitigated the heat impact through higher photosynthetic functioning, upregulation of protective molecules,

as well as through higher activity of some antioxidant enzymes. Such high [CO₂]-dependent effects on antioxidant defences likely favoured the maintenance of ROS at controlled levels and would in turn justify the lower heat impact on the photosynthetic components under elevated [CO₂] (Rodrigues et al., 2016). Therefore, our findings clearly extend our understanding why high [CO₂] constitutes a key player to coffee heat resilience and acclimation, what is clearly relevant in the context of predicted future global warming scenarios for the coffee crop sustainability.

Funding

This work was supported by national funds from Fundação para a Ciência e a Tecnologia through the projects PTDC/AGR-PRO/3386/2012, the research units UID/AGR/04129/2013 (LEAF) and UID/GEO/04035/2013 (GeoBioTec), as well through the grant SFRH/BPD/47563/2008 (A.S. Fortunato) co-financed through the POPH program subsidized by the European Social Fund. Brazilian funding from CAPES (grants PDSE: 000427/2014-04, W.P. Rodrigues; 0343/2014-05, M.Q. Martins; 12226/12-2, L.D. Martins), CNPq and Fapemig (fellowships to F.M. DaMATTA, F. Partelli and E. Campostrini) are also greatly acknowledged.

Acknowledgements

The authors would like to thank DELTA Cafés (Portugal) for technical assistance, and Profs. T. Sera (IAPAR) for supplying IPR108 material. To CAPES by the subscript in PDSE: 0343 / 2014-05, M.Q. Martins.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are not any potential conflicts of interest.

Author Contributions

According to their competences, all authors contributed transversally to the several stages of the work, including its design, data acquisition, analysis and interpretation, critically review of the manuscript, and approval of the submitted version.

6. References

- ABDELGAWAD, H.; FARFAN-VIGNOLO, A.R.; VOS, D.; ASARD, H. Elevated CO₂ mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Sci.* 231, 1-10, 2015.
- ADAMSKA, I. "The Elip family of stress proteins in the thylakoid membranes of pro- and eukaryote", in *Advances in Photosynthesis and Respiration-Regulation of Photosynthesis*, Vol 11, ed. E.M. Aro and B. Andersson (Dordrecht, Kluwer Academic Publishers), 487-505, 2001.
- AINSWORTH, E.A.; AND ROGERS, A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell Environ.* 30, 258-270, 2007.
- ASADA, K. "Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress", in *Photoinhibition of photosynthesis – From molecular mechanisms to the field*, ed. N.R. Baker and J.R. Bowyer (Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd.), 129-142, 1994.
- BADER, M.K.-F.; SIEGWOLF, R.; AND KÖRNER, C. Sustained enhancement of photosynthesis in mature deciduous forest trees after 8 years of free air CO₂ enrichment. *Planta.* 232, 1115-1125, 2010.
- BATISTA-SANTOS, P.; LIDON, F.C.; FORTUNATO, A.; LEITÃO, A.E.; LOPES, E.; PARTELLI, F.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. – Photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. *J. Plant Physiol.* 168, 792-806, 2011.
- BITA, C.E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers Plant Sci.* 4, art 273:1-18, 2013.
- BOKHARI, S.A.; WAN, X.-Y.; YANG, Y.W.; ZHOU, L.; TANG, W.-L.; LIU, J.-Y. Proteomic response of rice seedling leaves to elevated CO₂ levels. *J Proteome Res.* 6, 4624-4633, 2007.
- BOISVENUE, C.; RUNNING, S.W. Impacts of climate change on natural forest productivity – evidence since the middle of the 20th century. *Global Change Biol.* 12(5), 862-882, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976.
- BUNN, C.; LÄDERACH, P.; RIVERA, O.O.; KIRSCHKE, D. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Climatic Change.* 129, 89-101, 2015.
- CAMARGO, M.B.P. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. *Bragantia.* 69(1), 239-247, 2010.
- CAVATTE, P.C.; OLIVEIRA, A.A.G.; MORAIS, L.E.; MARTINS, S.C.V.; SANGLARD, L.M.V.P.; DAMATTA, F.M. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. *Physiol. Plant.* 114, 111-122, 2012.
- CHAVES, A.R.M.; TEN-CATEN, A.; PINHEIRO, H.A.; RIBEIRO, A.; DAMATTA, F.M. Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.). *Trees.* 22, 351-361, 2008.
- CRAPARO, A.C.W.; VAN ASTEN, P.J.A.; LÄDERACH, P.; JASSOGNE, L.T.P.; GRAB, S.W. *Coffea arabica* yields decline in Tanzania due to climate change: Global implications. *Agric. For. Meteorol.* 207, 1-10, 2015.

- DAMATTA, F.M.; GODOY, A.G.; MENEZES-SILVA, P.E.; MARTINS, S.C.V.; SANGIARD, L.M.V.P.; MORAIS, L.E.; TORRE-NETO, A.; RAQUEL GHINI, R. Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *J. Exp. Bot.* 167, 341-352, 2016.
- DAMATTA, F.M., GRANDIS, A., ARENQUE, B.C., AND BUCKERIDGE, M.S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Res. Int.* 43, 1814-1823, 2010.
- DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 55-81, 2006.
- ERICE, G.; ARANJUELO, I.; IRIGOYEN, J.J.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Effect of elevated CO₂, temperature and limited water supply on antioxidant status during regrowth of nodulated alfalfa. *Physiol. Plant.* 130, 33-45, 2007.
- FARIA, T., WILKINS, D., BESFORD, R.T., VAZ, M., PEREIRA, J.S., CHAVES, M.M. Growth at elevated CO₂ leads to down-regulation of photosynthesis and altered response to high temperature in *Quercus suber* L. seedlings. *J. Exp. Bot.* 47, 1755-1761, 1996.
- FEIERABEND, J. "Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defense", in *Antioxidants and reactive oxygen in plants*, ed. N. Smirnov (Oxford, Blackwell Publishing), 99-140, 2005.
- FORTUNATO, A.; LIDON, F.C.; BATISTA-SANTOS, P.; LEITÃO, A.E.; PAIS, I.P.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea spp.* under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *J. Plant Physiol.* 167, 333-342, 2010.
- FOYER, C.H. "The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants", in *Oxidative stress in plants*, ed. D. Inzé and M. Van Montagu (London, Taylor & Francis), 33-68, 2002.
- FRAGKOSTEFANAKIS, S.; RÖTH, S.; SCHLEIFF, E.; SCHARF, K.-D. Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks. *Plant Cell Environ.* 38, 1881-1895, 2015.
- GHINI, R.; TORRE-NETO, A.; DENTZIEN, A.F.M.; GUERREIRO-FILHO, O.; LOST, R.; PATRÍCIO, F.R.A.; PRADO, J.S.M.; THOMAZIELLO, R.A.; BETTIOL, W.; DAMATTA, F.M. Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO₂ enrichment. *Clim. Change.* 132, 307-320, 2015.
- GOULAO, L.; FORTUNATO, A.; RAMALHO, J.C. Selection of reference genes for normalizing quantitative qReal-Time PCR gene expression data with multiple variables in *Coffea spp.* *Plant Mol. Biol. Rep.* 30, 741-759, 2012.
- HALDIMANN, P.; FELLER, U. Inhibition of photosynthesis by high temperature in oak (*Quercus pubescens* L.) leaves grown under natural conditions closely correlates with a reversible heat-Udependent reduction of the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Cell Environ.* 27, 1169-1183, 2004.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: Kourosh Vahdati D., ed. *Abiotic stress - plant responses and applications in agriculture*. InTech, 169-205, 2013.
- HU, X.; LIU, R.; LI, Y.; WANG, W.; TAI, F.; XUE, R.; LI, C. Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined

- drought and heat stress. *Plant Growth Reg.* 60, 225-235, 2010.
- HUTIN, C.; NUSSAUME, L.; MOISE, N.; MOYA, I.; KLOPPSTECH, K.; HAVAUX, M. Early light-induced proteins protect Arabidopsis from photooxidative stress. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 100, 4921-4926, 2003.
- IPCC. (2013). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Summary for Policymakers, Technical Summary and Frequent Asked Questions. Part of the Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, ed. T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M.M.B. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, P.M. Midgley. Intergovernmental Panel on Climate Change, p. 203. ISBN 978-92-9169-138-8.
- IPCC. (2014). *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, ed. O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel, J.C. Minx (Cambridge, Cambridge University Press, UK and New York, USA), p. 1435. ISBN 978-1-107-65481-5.
- KALITUHO, L.; RECH, J.; JAHNS, P. The roles of specific xanthophylls in light utilization. *Planta*. 225, 423-439, 2007.
- KANWISCHER, M.; PORFIROVA, S.; BERGMÜLLER, E.; DÖRMANN, P. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of Arabidopsis affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiol.* 137, 713-723, 2005.
- KIRSCHBAUM, M.U.F. Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies. *Plant Physiol.* 155, 117-124, 2011.
- LAMBERS, H.; CHAPIN, F.S.; PONS, J.L. *Plant Physiological Ecology*, 2nd ed.. Springer-Verlag, New York, 2008.
- LI, X.; AHAMMED, G.; ZHANG, Y.; ZHANG, G.; SUN, Z.; ZHOU, J.; ZHOU, Y.; XIA, X.; YU, J.; SHI, K. Carbon dioxide enrichment alleviates heat stress by improving cellular redox homeostasis through an ABA-independent process in tomato plants. *Plant Biol.* 17, 81-89, 2014.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148, 350-382, 1987.
- LICHTENTHALER, H.K.; BABANI, F. "Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity", in *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, ed. G.C. Papageorgiou and Govindjee (Dordrecht, The Netherlands, Springer), 713-736, 2004.
- LOGAN, B.A. "Reactive oxygen species and photosynthesis", in *Antioxidants and reactive oxygen in plants*, ed. N. Smirnov (Oxford, Blackwell Publishing), 250-267, 2005.
- LONG, S.P.; AINSWORTH, E.A.; LEAKEY, A.D.B.; NÖSBERGER, J.; ORT, D.R. Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science*. 312, 1918-1921, 2006.
- LUO, Y.; REYNOLDS, J.; WANG, Y.; WOLFE, D. A search for predictive understanding of plant responses to elevated [CO₂]. *Global Change Biol.* 5, 143-156, 1999.
- MAO, J.; CHI, W.; OUYANG, M.; HE, B.; CHEN, F.; ZHANG L. PAB is an

assembly chaperone that functions downstream of chaperonin 60 in the assembly of chloroplast ATP synthase coupling factor 1. *PNAS* 112, 4152-4157, 2015.

MARTINS, L.D.; TOMAZ, M.A.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. *Clim. Change*. 126, 365-379, 2014.

MATSUBARA, S.; CHEN, Y.X.; CALIANDRO, R.; GOVINDJEE, CLEGG, R.M. Photosystem II fluorescence lifetime imaging in avocado leaves: Contributions of the lutein-epoxide and violaxanthin cycles to fluorescence quenching. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 104, 271-284, 2011.

MUNNÉ-BOSCH, S. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162, 743-748, 2005.

NJEMINI, R.; DEMANET, C.; METS, T. Determination of intracellular heat shock protein 70 using a newly developed cell lysate immunometric assay. *J. Immunol. Meth.* 274, 271-279, 2003.

POMPELLI, M.F.; MARTINS, S.C.V.; ANTUNESM W.C.; CHAVES, A.R.M.; DAMATTA, F.M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. *J. Plant Physiol.* 167, 1052-1060, 2010.

PRASAD, P.V.V.; BOOTE, K.J.; ALLEN, JR.L.H.; THOMAS, J.M.G. Super-optimal temperatures are detrimental to peanut (*Arachis hypogaea* L.) reproductive processes and yield at both ambient and elevated carbon dioxide. *Global Change Biol.* 9: 1775-1787, 2003.

PRITCHARD, S.G.; JU, Z.; SANTEN, E.; QIU, J.; WEAVER, D.B.; PRIOR, S.A.; ROGERS, H.H. The influence of elevated CO₂ on the activities of antioxidative enzymes in two soybean genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 1061-1068, 2000.

RAMALHO, J.C.; CAMPOS, P.S.; TEIXEIRA, M.; NUNES, M.A. Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Sci.* 135, 115-124, 1998.

RAMALHO, J.C.; DAMATTA, F.M.; RODRIGUES, A.P.; SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.; BATISTA-SANTOS, P.; PARTELLI, F.L.; RIBEIRO, A.; LIDON, F.C.; LEITÃO, A.E. Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 26, 5-18, 2014.

RAMALHO, J.C.; FORTUNATO, A.S.; GOULAO, L.F.; LIDON, F.C. Cold-induced changes in mineral content in leaves of *Coffea* spp. Identification of descriptors for tolerance assessment. *Biol. Plant.* 57(3), 495-506, 2013.

RAMALHO, J.C.; PONS, T.; GROENEVELD, H.; NUNES, M.A. Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposure in relation to N availability. *Physiol. Plant.* 101, 229-239, 1997.

RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SIMÕES-COSTA, M.C.; LEITÃO, A.E.; FORTUNATO, A.S.; BATISTA-SANTOS, P.; PALOS, I.M.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LIDON, F.C.; DAMATTA F.M. Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. *PLoS ONE*. 8(12), e82712, 2013b.

RODRIGUES, W.P.; MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.S.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; SIMÕES-COSTA, M.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; COLWELL, F.; GOULAO, L.; MÁGUAS, C.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic

- functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Global Change Biol.* 22, 415-431, 2016.
- SALAZAR-PARRA, C.; AGUIRREOLEA, J.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; IRIGOYEN, J.J.; MORALES, F. Climate change (elevated CO₂, elevated temperature and moderate drought) triggers the antioxidant enzymes response of grapevine cv. Tempranillo, avoiding oxidative damage. *Physiol. Plant.* 144, 99-110, 2012.
- SANTARIUS, K.A. The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. *Planta.* 113, 105-114, 1973.
- SANTOS, T.B.; BUDZINSKI, I.G.F.; MARUR, C.J.; PETKOWICZ, C.L.O.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 441-448, 2011.
- SCHRODA, M.; VALLON, O.; WOLLMAN, F.A.; BECK, C.F. A chloroplast targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell.* 11, 1165-1178, 1999.
- SICHER, R. Combined effects of CO₂ enrichment and elevated growth temperatures on metabolites in soybean leaflets: evidence for dynamic changes of TCA cycle intermediates. *Planta.* 238, 369- 380, 2013.
- SMIRNOFF, N. "Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions", in *Antioxidants and reactive oxygen in plants*, ed. N. Smirnov (Oxford, Blackwell Publishing), 1-24, 2005.
- SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* 126, 45-51, 2006.
- VAN DER VOSSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): A review. *Euphytica.* 204, 243-256, 2015.
- VICENTE, R.; PÉREZ, P.; MARTÍNEZ-CARRASCO, R.; USADEL, B.; KOSTADINOVA, S.; MORCUENDE, R. Quantitative RT-PCR platform to measure transcript levels of C and N metabolism-related genes in durum wheat: Transcript profiles in elevated [CO₂] and high temperature at different levels of N supply. *Plant Cell Physiol.* 56(8), 1556-1573, 2015.
- VURRO, E.; BRUNI, R.; BIANCHI, A.; TOPPI, L.S. Elevated atmospheric CO₂ decreases oxidative stress and increases essential oil yield in leaves of *Thymus vulgaris* grown in a mini-FACE system. *Environ. Exp. Bot.* 65, 99-106, 2009.
- WAY, D.A.; OREN, R.; KRONER, Y. The space-time continuum: the effects of elevated CO₂ and temperature on trees and the importance of scaling. *Plant Cell Environ.* 38, 991-1007, 2015.
- WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199-223, 2007.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9, 244-252, 2004.
- WERNER, C.; CORREIA, O.; BEYSCHLAG, W. Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Funct. Plant Biol.* 29, 999-1011, 2002.
- WOODWARD, F.I. Potential impacts of global elevated CO₂ concentrations on

plants. *Cur. Op. Plant Biol.* 5, 207-211, 2002.

ZHANG, H.; HUANG, D.; CRAMER, W.A. Stoichiometrically bound β -carotene in the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. *J. Biol. Chem.* 274, 1581-1587, 1999.

Capítulo 2

Selection and validation of reference genes for accurate qRT-PCR data normalization in *Coffea* spp. under a climate changes context of interacting high air [CO₂] and temperature

Abstract - Coffee is one of the most important agricultural traded commodities. Recent experimental studies showed that increasing air [CO₂] mitigates heat impacts, greatly softening the early modelling estimates of strong reduction of adequate areas for this crop due to future climate changes. Gene expression studies are an important tool to unravel crop acclimation ability, demanding the use of adequate reference genes. We have examined the stability of 10 candidate reference genes to normalize qRT-PCR expression studies using a set of 24 cDNAs from leaves of three coffee genotypes (CL153, Icatu and IPR108), grown under 380 or 700 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$, and submitted to increasing temperatures from 25/20°C (day/night) to 42/34°C. Samples were analyzed according to genotype, [CO₂], temperature, multiple stress interaction ([CO₂], temperature) and total stress interaction (genotype, [CO₂] and temperature). The expression stability of each gene was assessed through a multiple analytical approach combining the Coefficient of Variation method and three algorithms (geNorm, BestKeeper, NormFinder). The expression stability varied according to the type of stress for most genes, but the consensus ranking obtained with RefFinder, classified *MDH* as the most stable gene to a global use, followed by *ACT* and *S15*, whereas *α -TUB* and *CYCL* were observed to be the least stable ones. Using the coffee expression profiles of the gene encoding the large-subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (*RLS*), results from the *in silico* aggregation and experimental validation of the best number of reference genes showed that two reference genes are adequate to normalize qRT-PCR data. Altogether, this work highlights the importance of an adequate selection of reference genes for each single or combined experimental condition and constitutes the basis to accurately study molecular responses of *Coffea* spp. in a context of climate changes and global warming.

Keywords - climate changes, coffee, increased air [CO₂], global warming, heat stress, normalization of transcriptomic studies, quantitative real-time PCR, reference genes.

Abbreviations - qRT-PCR - quantitative real-time polymerase chain reaction.

Funding - This work was supported by by national funds from Fundação para a Ciência e a Tecnologia through the projects PTDC/AGR-PRO/3386/2012, the research units UID/AGR/04129/2013 (LEAF) and UID/GEO/04035/2013(GeoBioTec), as well through the grant SFRH/BPD/47563/2008 (A.S. Fortunato) co-financed through the POPH program subsidized by the European Social Fund. Brazilian funding from CAPES (grants PDSE: 000427/2014-04, W.P. Rodrigues; 0343/2014-05, M.Q. Martins), CNPq and Fapemig (fellowships to F.M. DaMATTA, F. Partelli and E. Campostrini) are also greatly acknowledged.

1. Introduction

Impacts from recent climate-related extremes, such as heat and cold waves, droughts and strong rainfall events, reveal remarkable vulnerability of agricultural systems. Estimated future climate changes are expected to further amplify the existing climate-related risks and create new ones (IPCC, 2013). Within this context, it is important to assess crop ability to adapt their vital processes at a speed compatible with these environmental changes, allowing the selection and breeding of elite genotypes.

Coffee is one of the most important agricultural traded commodities, growing in more than 60 tropical countries. It is estimated that *ca.* 25 million farmers produce coffee in over 1 million ha, with a majority of smallholders whose livelihoods depend on this crop (Waller et al., 2007). In the last years, worldwide crop yields were above 8 million tons of green coffee beans (ICO, 2014a), generating an income of *ca.* US\$ 173,000 million (ICO, 2014b), and involving approximately 100 million people considering the entire chain of value of coffee (Bunn et al., 2015).

Coffee production and quality are highly dependent on a regular sequence of climate events; temperature and water availability are considered the most important limiting environmental variables to this crop (DaMATTA and Ramalho, 2006). Also, several modelling studies on the global impact of climate changes, mostly focused on increased air temperatures, have predicted reductions of suitable areas for Arabica coffee (up to *ca.* 50%) by 2050 (Bunn et al., 2015; Magrath and Ghazoul, 2015), compromising the livelihoods of millions of small householders.

Under field conditions, the superimposition of environmental events is the most common situation, as is expected to be the case of high air [CO₂] and enhanced temperatures predicted along this century. In fact, depending on anthropogenic greenhouse gas emission scenarios, [CO₂] might reach between 421 and 936 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ by 2100, accompanied by a global warming up to between 2.6 and 4.8 °C relative to 1986-2005 (IPCC, 2013; 2014). However, it was recently shown that high air [CO₂] strengthens the coffee plant by reinforcing

its photosynthetic performance (Ramalho et al., 2013; Ghini et al., 2015; DaMATTA et al., 2016). Furthermore, high [CO₂] has a crucial role in the mitigation of heat impact, and, therefore, in the resilience of coffee plant to supra-optimal temperatures, with positive repercussions ranging from mineral nutrition (Martins et al., 2014) to the triggering of defence mechanisms and altered gene expression (Martins et al., 2014; Rodrigues et al., 2016). Therefore, the catastrophic predictions on the future of the coffee crop, that are based almost exclusively on temperature drift (Rodrigues et al., 2016), should be reconsidered. In addition, results from Rodrigues et al. (2016) strongly suggest the need to study the single and superimposed effects of high [CO₂] and supra-optimal temperatures at all plant levels, from morphology up to the molecular assessment.

The release of *Coffea spp.* expressed sequence tag (EST) databases (e.g., Poncet et al., 2006; Vieira et al., 2006; Mondego et al., 2011) and *Coffea canephora* genome (<http://coffee-genome.org/>) has greatly prompted the study of genes involved in important agronomic and stress tolerance traits, making marker-assisted selection a straight forward approach. Gene expression analysis is an important tool to elucidate the complex regulatory networks of the genetic, signaling and metabolic mechanisms that underlie plant-environmental interactions (Mallona et al., 2010). Monitoring differential gene expression and validating high-throughput RNA sequencing (RNA-seq) data is ideally achieved through quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis. However, accuracy and reliability of qRT-PCR relies on the normalization of gene expression data (Artico et al., 2010; Die et al., 2010). To avoid severe pitfalls in data analysis and interpretation, this implies the selection and systematic validation of suitable reference genes to be used as internal controls. In fact, expression stability should be validated for each particular plant tissue/organ, cell and experimental conditions, particularly when involving environmental stressful conditions (Die et al., 2010; El Kelish et al., 2014; Imai et al., 2014; da Costa et al., 2015). In addition, the stability of reference gene expression is also species-dependent (Andersen et al., 2004; Gutierrez et al., 2008a,b), as in the case of coffee (Cruz et al., 2009; Goulao et al., 2012). A number of housekeeping genes (e.g., b-actin, elongation factor1a, 18S ribosomal RNA, and polyubiquitin) involved in general

cell metabolism pathways are widely used to calibrate qRT-PCR studies in biological systems (Willems et al., 2008; Goulao et al., 2012, da Costa et al., 2015; Imai et al., 2015; Llanos et al., 2015). However, their expression levels may vary with the experimental conditions (Petriccione et al., 2015), and their use as internal reference genes should be taken with caution (Gutierrez et al. 2008a,b). For instance, *GAPDH* has been indicated as one of the most stable genes during single abiotic stresses (Tian et al., 2015), whereas it appeared to be the least stable gene during the plant development (Wang et al., 2016). In addition, the species-dependent stability of reference gene expression was observed, for example, in *TUB-A*, which is the most stable reference gene during celery development (Li et al., 2016) in contrast with what has been observed during the development of cherry (Ye et al., 2015).

In a context of advancing our knowledge regarding the plant responses to estimated climate changes and global warming, this work examined, for the first time, the stability of candidate reference genes to accurately perform the normalization of qRT-PCR data from expression studies of *Coffea* spp. plants exposed to conditions mimicking predicted future environmental conditions. Single and combined impacts of high air [CO₂] and heat were considered.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material and growth conditions

Plant materials and experimental design was previously described in detail (Rodrigues et al., 2016). Briefly, three widely cropped coffee genotypes from the two main producing species were used: *Coffea arabica* L. cv. Icatu (an introgressed variety from *C. canephora* Pierre ex A. Froehner), *C. arabica* L. cv. IPR108, and *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153). Potted plants of 1.5 years in age were transferred from a greenhouse (ambient [CO₂]) into walk-in growth chambers (EHHF 10000, ARALAB, Portugal) differing in air [CO₂] supply: 380 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ (380-plants) or 700 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ (700-plants). Both groups of plants were then grown for 10 months in 28 L pots for ca. 10 months under controlled environmental conditions of temperature (25/20°C, day/night), RH (75%), irradiance (ca. 700-800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), photoperiod (12 h), without limitations of

nutrients, water and space for root growth. After that, air temperature was gradually increased at a rate of $0.5^{\circ}\text{C day}^{-1}$, from $25/20^{\circ}\text{C}$ up to $42/34^{\circ}\text{C}$, with a 7 day stabilization at $31/25$, $37/30$ and $42/34^{\circ}\text{C}$ to perform several evaluations (Martins et al. 2014, 2016, Rodrigues et al. 2016). Leaf material was collected from newly matured leaves, of both plagiotropic and orthotropic branches of the upper (illuminated) part of the plant, from five to eight plants per genotype and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

2.2 Total RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated and quantified as described in Goulao et al. (2012) for each of the following 24 conditions: three genotypes (CL153, Icatu, IPR108), four temperature regimes ($25/20^{\circ}\text{C}$, $31/25^{\circ}\text{C}$, $37/30^{\circ}\text{C}$, $42/34^{\circ}\text{C}$), and two $[\text{CO}_2]$ (380 , $700 \mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$), using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. In order to avoid eventual genomic DNA contaminations, RNA samples were digested with Ambion® DNA-free™ DNase (Ambion, USA). RNA integrity was verified in 1.5% agarose – TAE gel electrophoresis containing GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA). All RNA samples were individually analyzed for the possible presence of DNA contamination by standard PCR reactions (35 cycles) using primers designed for ubiquitin (UBQ) gene (Table 1), in the absence of cDNA synthesis. Total RNA concentration and purity were further verified through BioDrop Cuvette (BioDrop, UK) measurements to guarantee the same amount of starting material in subsequent cDNA synthesis. RNA concentrations ranged between 333 and 1056 ng/ μl , with OD 260:280 ratios always above 1.98.

One microgram of DNA-free total RNA was used to synthesize first-strand cDNAs using oligo-(dT)₁₈ primer and the SuperScript II first-strand synthesis system (Invitrogen, USA).

Table 1 - Primer sequences and amplicon characteristics for each of the ten candidate reference genes under evaluation.

| Gene Symbol | Primer Sequence (5'-3') | Gene Name | Acession Number | Amplicon Size (bp) |
|----------------------|--|--|------------------------|---------------------------|
| <i>UBQ2</i> | GATGATACTTGGCCCTGCAC CCTTCCCAGCTTGTCAATGT | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 | GR984245 | 142 |
| <i>α-Tub</i> | GTGCATCTCCATCCACATTG GGTGTTGAAAGCGTCGTCT | Alpha-tubulin | GT009437 | 146 |
| <i>S15</i> | CAATAGGGGCTTGAAGAGG TACGCTGCCAATCATCTCAG | 40S ribosomal protein S15 | GR987196 | 146 |
| <i>DNAJ</i> | GGTGAAGCTGATGAAGCAC CCGGGCTGGGATTTAATAAG | Plant DNA J protein | GR986679 | 157 |
| <i>MDH</i> | CCTGATGTCAACCACGCAACT GTGGTTATGAACTCTCCATTCAACC | Malate dehydrogenase | GW464198.1 | 100 |
| <i>ACT</i> | AAGCTTGCCTATGTGGCTCTTG TCACTTGTCCATCTGGCAATTC | Actin | GT000704 | 100 |
| <i>ELF-4A</i> | GGTTATGCGTGCTCTGGGTGAC ATGAACCCCACTGGAAAGAATG | Eukaryotic initiation factor 4α | GT71729 | 103 |
| <i>CYCL</i> | AGCTCTACGCAGACACGACTCC GGTCGATCCTTTGAAGTGCAAG | Cyclophilin | GT007167 | 115 |
| <i>EF1A</i> | CATTGTGGTCATTGGTCATGTC ACACGCTTGTC AATTCCTCCA | Elongation factor 1α | GR996930 | 87 |
| <i>GAPDH</i> | AGGCTGTTGGGAAAGTTCTTC ACTGTTGGAAC TCGGAATGC | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | DV692958 | 100 |

2.3 Selection of Reference Gene Sequences and Primer Design

A set of 10 candidate genes were selected, comprising several frequently used reference genes, based on previous reports in (a) coffee plants (Cruz et al., 2009; Goulao et al., 2012; Carvalho et al., 2013): actin (*ACT*), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), eukaryotic initiation factor 4 α (*EIf4A*), elongation factor 1 α (*EF1A*), cyclophilin (*CYCL*) and malate dehydrogenase (*MDH*); and (b) other plants (Cseke et al., 2009; El Kelish et al., 2014; Yan et al., 2014; Watanabe et al., 2014): 40S ribosomal protein subunit 15A (*s15*), DNAJ-like (*DNAJ*), ubiquitin-conjugating enzyme E2 (*UBQ2*) and α -tubulin (*α -TUB*). The corresponding gene sequences were retrieved from published literature and the NCBI databases (Cruz et al., 2009; Vidal et al., 2010; Mondego et al., 2011; Goulao et al., 2012; Carvalho et al., 2013). Primers were designed using Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000). The length of the primers was set to be between 19 and 26 bp, with a GC content ranging from 45% to 60% and a melting temperature (T_m value) between 62°C and 65°C. Amplicon length ranges were set to be between 100 and 150 bp. The probability of formation of hairpin structures and primer dimerization was subsequently checked using the Oligo Calculator (ver. 3.26) algorithm (Kibbe, 2007). Primer sequences are given in Table 1.

2.4 Quantitative real-time polymerase chain reaction conditions

qRT-PCR reactions were performed in 96-well plates using iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, USA). Reactions were prepared in volumes of 25 μ l containing 150 ng of cDNA and 3 μ M each primer, in 1 \times iQ™ SYBR® Green Supermix. Reactions were run on the iQ™5 Real-Time Detection System (BioRad, USA) using the following parameters: hot start activation of the TaqDNA polymerase at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation 95°C for 15 s; annealing at 60°C for 30 s; elongation at 72°C for 30 s; and plate read. To verify the specificity of each amplification, and the absence of primer dimers, dissociation curves were obtained for each amplicon at the end of the PCR run, by continuous fluorescence measurement from 55°C to 95°C, with sequential steps of 0.5°C for 15 s. Three technical replicates were used for each biological replicate and the mean Ct was used for data analyses. The full sample set was always included in each technical replicate to exclude any artifacts consequential of between-run variations. No signals were detected in non-template controls run in parallel for

each primer set. Two negative controls were included for each primer pair, in which cDNA was replaced by water or total RNA.

2.5 Calculation of PCR Efficiencies

Five-fold serial dilutions (1:1–1:625), spanning five orders of magnitude from pooled cDNAs that included equal-molar quantities of all samples independently for each genotype, were quantified in triplicates to generate standard curves for each primer pair. Based on the slopes of the standard curves, the PCR efficiency of each gene, for each genotype, was determined from the respective logarithm of the cDNA dilution, plotted against the mean threshold cycle (Ct) values. The reaction efficiency was calculated using the equation: $E (\%) = (10^{-(1/\text{slope})} - 1) \times 100$ (da Costa et al., 2015), where E is the efficiency, in percentage, and slope is the gradient of the best-fit line in the linear regression.

2.6 Selection of reference genes

The global expression variability of each candidate reference gene was analyzed through statistical parameters using Box Plot. The variation of gene expression was calculated by means of coefficient of variation (CV), where $CV = (\text{standard deviation} / \text{mean}) \times 100$. These analyzes were performed using the statistical program R Core Team (2016). In order to select the best reference genes for the experimental conditions, expression stability was analyzed using geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004) and BestKeeper (Pfaffl et al., 2004). The final rank of reference genes was determined with the RefFinder program (Xie et al., 2012), a web-based user-friendly comprehensive tool that integrates geNorm, Normfinder, BestKeeper, and the comparative Ct method.

2.7 Determination of the minimum number of reference genes for data normalization

The pairwise variations (V values) were calculated using the final ranking determined by RefFinder, through pairwise variation (V_n/V_{n+1}) of two consecutively serial log₂-transformed normalization factor (NF) ratios, based on stepwise addition of the subsequent more stable reference gene (NF_n relative to NF_{n+1} reference genes) (Vandesompele et al., 2002). The SD of the array generated by

the log₂-transformed NF ratios was calculated for each NF combination (V_n/V_{n+1}). V_n/V_{n+1} were then plotted, representing changes in expression stability of NF. The optimal number of reference genes to exact standards was determined by calculating values as a pair of variation (V_n/V_{n+1}) between two normalization factors consecutively classified (NC) after the gradual addition of more subsequent stable reference gene (NF_n and NF_{n+1}), as proposed by Vandesompele et al. (2002), included in GeNorm package. A cut off value <0.15 was adopted (da Costa et al., 2015; Niu et al., 2015; Petriccione et al., 2015; Yang et al., 2015).

2.8 Validation of reference gene analysis

The transcriptional activity of RLS gene, encoding the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) large subunit, along the imposed temperatures (25/20°C, 31/25°C, 37/30°C, 42/34°C), and under both growth [CO₂] (380, 700 μL CO₂ L⁻¹) was analyzed by qRT-PCR, using the most stable genes (one, two and three) versus the least stable genes. The qRT-PCR amplification conditions were the same as described above. The relative expression data and statistical analysis were performed using the REST 2009 software developed by Pfaffl (Technical University Munich) and Qiagen (Germany). Rest analysis takes into account PCR efficiencies and normalization gene, using the test hypothesis P (H1), i.e., the probability of difference between target and control groups be by chance. P (H1) performs at least 2000 times of random reallocations of target samples and controls between the groups. Statistical differences were considered significant when P < 0.05 (** P < 0.001; P < 0.01 * P < 0.05).

3. Results and Discussion

A total of 10 candidate genes (CG) to obtain an accurate validation of qRT-PCR data were assessed considering the individual comparison groups, i.e., genotype, [CO₂] and temperature, multiple stress interaction ([CO₂] and temperature) and total stress interaction (genotype, [CO₂] and temperature). To determine the specificity of the primer pairs used in this study, melting curve analysis was performed after 40 cycles of amplification. The single peak obtained confirmed the specificity of the amplicon. No signal was detected in the negative

controls of all tested primers. The standard curve method using a pool of all cDNA samples was performed to calculate qRT-PCR efficiency (E) and the correlation coefficient (R^2) of each primer pair (Table 2). The raw quantification cycle (Ct) values ranged from 21.2 to 38.2 across all of the tested samples, with their minimal and maximal means falling between 24.1 ± 1.8 and 34.1 ± 2.1 (Figure 1).

Table 2 - Efficiency values and determination coefficient for each candidate reference genes under evaluation.

| Gene | qRT-PCR efficiency (%) and (R^2) | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|
| | CL153 | Icatu | IPR108 |
| <i>GAPDH</i> | 93.3(0.99) | 95.7(0.98) | 93.9(0.98) |
| <i>EF-1A</i> | 96.3(0.99) | 82.7(0.99) | 97.3(0.96) |
| <i>ELF-4A</i> | 90.8(0.99) | 90.9(0.98) | 93.3(0.96) |
| <i>CYCL</i> | 87.1(0.96) | 80.3(0.98) | 80.3(0.98) |
| <i>ACT</i> | 91.4(0.93) | 98.7(0.93) | 97.9(0.91) |
| <i>DNAJ</i> | 82.5(0.99) | 86.4(0.99) | 97.7(0.98) |
| <i>S15</i> | 99.9(0.96) | 98.8(0.98) | 90.0(0.95) |
| <i>MDH</i> | 80.3(0.99) | 92.0(0.96) | 92.1(0.97) |
| <i>α-TUB</i> | 99.3(0.96) | 93.4(0.98) | 94.0(0.99) |
| <i>UBQ2</i> | 98.1(0.97) | 91.2(0.93) | 92.2(0.94) |

The results showed that *GAPDH* and *α -TUB* were the most and least abundantly expressed genes with mean Ct of 24.4 and 30.7, respectively. *EF-1A* showed the most variable levels of expression. Collectively, these results indicate that the transcript levels of the several candidate genes (CG) varied across different experimental samples confirming the need to screen the most appropriate reference genes for each experimental condition to accurately normalize qRT-PCR gene expression data. This result is common in plants given that most reference genes are involved in functions other than basal cell metabolism (da Costa et al., 2015; Goulao et al., 2012).

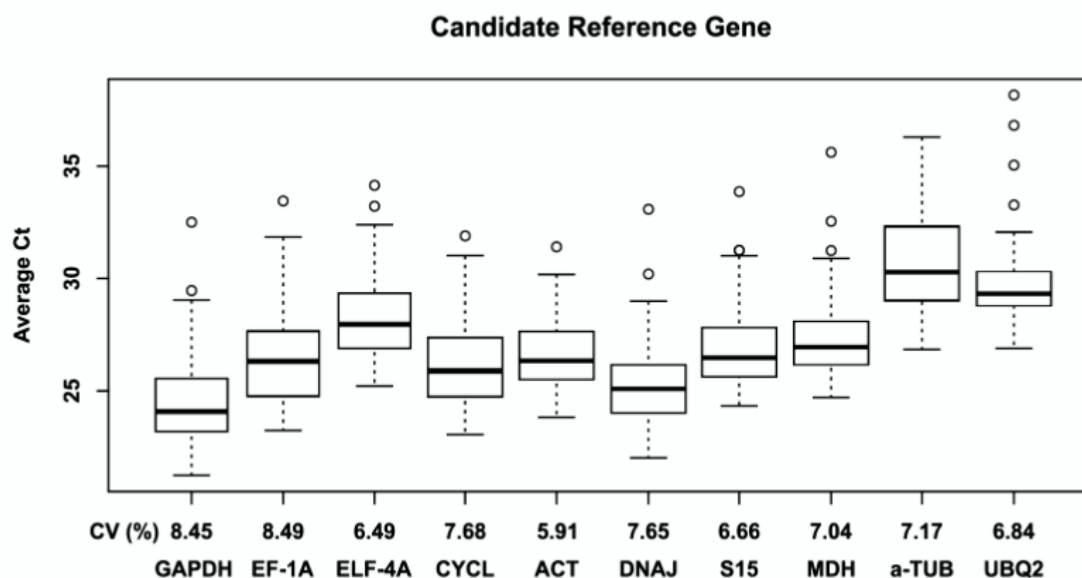


Figure 1 - Box plot representing the expression profiling variations of each candidate reference gene. The primer pairs of each gene were used to examine all samples ($n=24$; Table 1). *Boxes* indicate the 25th and 75th percentiles; *lines across the box* represent the median Ct values; *whisker caps* represent the minimum and maximum values; and *spots* represent the outliers.

According to the Coefficient of Variation (CV) method, the most stable genes were *ACT* (for genotype and total stress, CV = 5.91 in both cases), *UBQ2* (for temperature, CV = 5.50 and [CO₂], CV = 5.71), and *S15* (for multiple stress, CV = 5.58) (Table 3).

Table 3 - Ranking of candidate reference genes according to its coefficient of variation (CV%), considering the variables genotype, temperature, [CO₂] and their interaction.

| Rank | Genotypes | | Temperature | | [CO ₂] | | Multiple stress | | Total stress | |
|------|---------------|------|---------------|------|--------------------|------|-----------------|------|---------------|------|
| | Gene | CV | Gene | CV | Gene | CV | Gene | CV | Gene | CV |
| 1 | <i>ACT</i> | 5.91 | <i>UBQ2</i> | 5.50 | <i>UBQ2</i> | 5.71 | <i>S15</i> | 5.58 | <i>ACT</i> | 5.91 |
| 2 | <i>ELF-4A</i> | 6.49 | <i>S15</i> | 5.82 | <i>ACT</i> | 5.73 | <i>ELF-4A</i> | 5.72 | <i>ELF-4A</i> | 6.49 |
| 3 | <i>S15</i> | 6.66 | <i>ACT</i> | 5.87 | <i>ELF-4A</i> | 5.76 | <i>ACT</i> | 6.19 | <i>S15</i> | 6.66 |
| 4 | <i>UBQ2</i> | 6.84 | <i>MDH</i> | 6.15 | <i>MDH</i> | 6.64 | <i>MDH</i> | 6.25 | <i>UBQ2</i> | 6.84 |
| 5 | <i>MDH</i> | 7.04 | <i>ELF-4A</i> | 6.38 | <i>S15</i> | 6.65 | <i>DNAJ</i> | 6.69 | <i>MDH</i> | 7.04 |
| 6 | <i>α-TUB</i> | 7.17 | <i>DNAJ</i> | 6.54 | <i>EF-1A</i> | 6.86 | <i>EF-1A</i> | 7.15 | <i>α-TUB</i> | 7.17 |
| 7 | <i>DNAJ</i> | 7.65 | <i>CYCL</i> | 6.75 | <i>α-TUB</i> | 6.96 | <i>CYCL</i> | 7.33 | <i>DNAJ</i> | 7.65 |
| 8 | <i>CYCL</i> | 7.68 | <i>GAPHD</i> | 6.93 | <i>CYCL</i> | 7.52 | <i>UBQ2</i> | 7.44 | <i>CYCL</i> | 7.68 |
| 9 | <i>GAPHD</i> | 8.45 | <i>α-TUB</i> | 7.22 | <i>GAPHD</i> | 8.94 | <i>GAPHD</i> | 7.74 | <i>GAPHD</i> | 8.45 |
| 10 | <i>EF-1A</i> | 8.49 | <i>EF-1A</i> | 8.34 | <i>DNAJ</i> | 9.68 | <i>α-TUB</i> | 7.95 | <i>EF-1A</i> | 8.49 |

EF-1A was ranked as the least stable gene for genotype (CV = 8.49), temperature (CV = 8.34) and overall stress (CV = 8.49), ranking in the 6th place for [CO₂] and multiple stress. *DNAJ* and *TUB* were the less stable genes for [CO₂] (CV = 9.68) and multiple stress treatments (7.95). Because the CV method alone is not sufficiently accurate to estimate gene stability (Goulao et al., 2012), a complementary analysis was performed based on three algorithms, geNorm, NormFinder and BestKeeper. According to the geNorm algorithm, the average expression stability (*M*-value) of all CG was below the default limit of 1.5 for genotype, temperature, [CO₂] and their respective interactions, therefore indicating a considerable high stability level (Table 4). *GAPDH* was consistently classified as the most stable gene for the five comparison groups while *CYCL* was the least stable gene for all groups with the exception of genotype, where *MDH* was the least stable gene. On the other hand, the ranking obtained with NormFinder was clearly dependent on the comparison group: *MDH* was the most stable for genotype, *UBQ2* for temperature, *GAPDH* for [CO₂] and *ELFA* for multiple and total stress groups. Such differences are due probably to different stability measures, *i.e.*, while geNorm calculates gene expression stability based on the average pairwise expression ratio, NormFinder estimates the overall expression variation to provide individual stability values (Kozera and Rapacz 2013). Nevertheless, similarly to geNorm, NormFinder also ranked *CYCL* as the least stable gene for all groups, with the exception for genotype (where α -TUB was the least stable CG).

In order to consolidate the data obtained with geNorm and NormFinder, we have included in the analysis the BestKeeper algorithm, which calculates the expression stabilities of the CG in accordance with SD and CV values. The calculated results classified *ACT* as the most stable gene for the genotype (together with *MDH*) and *S15* for the [CO₂] group. For temperature, multiple stress and overall stress groups the most stable gene was *MDH*. α -TUB, *EF-1A*, and *CYCL* were ranked as the least stable genes, always below the 6th place and usually in the three last positions. Despite the differences between the ranking obtained with the CV method and the three algorithms, which are related to the individual classification criteria, *CYCL* and α -TUB were consistently ranked in the bottom five positions.

Table 4 - Stability of candidate reference genes according to GeNorm, NormFinder and BestKeeper, considering the variables genotype, temperature, [CO₂] and their interaction. Significance is indicated as: ** P < 0.001; P < 0.01 * P < 0.05 ns = not significant.

| Group | Ranking | geNorm | | NormFinder | | BestKeeper | |
|--------------------|---------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|--------------------|
| | | Gene | Stability | Gene | Stability | Gene | R |
| Genotype | 1 | <i>GAPDH</i> | 0.24 | <i>MDH</i> | 0.005 | <i>ACT</i> | 0.97*** |
| | 2 | <i>ACT</i> | 0.26 | <i>DNAJ</i> | 0.009 | <i>MDH</i> | 0.97*** |
| | 3 | <i>EF-1A</i> | 0.27 | <i>UBQ2</i> | 0.010 | <i>ELF-4A</i> | 0.96*** |
| | 4 | <i>ELF-4A</i> | 0.28 | <i>S15</i> | 0.011 | <i>S15</i> | 0.95*** |
| | 5 | <i>UBQ2</i> | 0.29 | <i>ELF-4A</i> | 0.013 | <i>DNAJ</i> | 0.93*** |
| | 6 | <i>α-TUB</i> | 0.32 | <i>ACT</i> | 0.016 | <i>UBQ2</i> | 0.93*** |
| | 7 | <i>S15</i> | 0.33 | <i>EF-1A</i> | 0.020 | <i>GAPDH</i> | 0.93*** |
| | 8 | <i>CYCL</i> | 0.42 | <i>CYCL</i> | 0.026 | <i>CYCL</i> | 0.85*** |
| | 9 | <i>DNAJ</i> | 0.53 | <i>GAPDH</i> | 0.027 | <i>α-TUB</i> | 0.82*** |
| | 10 | <i>MDH</i> | 0.62 | <i>α-TUB</i> | 0.030 | <i>EF-1A</i> | 0.81** |
| Temperature | 1 | <i>GAPDH</i> | 0.14 | <i>UBQ2</i> | 0.041 | <i>MDH</i> | 0.98*** |
| | 2 | <i>UBQ2</i> | 0.14 | <i>ELF-4A</i> | 0.057 | <i>DNAJ</i> | 0.97*** |
| | 3 | <i>ELF-4A</i> | 0.16 | <i>GAPDH</i> | 0.060 | <i>UBQ2</i> | 0.96*** |
| | 4 | <i>ACT</i> | 0.16 | <i>DNAJ</i> | 0.071 | <i>ACT</i> | 0.96*** |
| | 5 | <i>S15</i> | 0.17 | <i>EF-1A</i> | 0.076 | <i>S15</i> | 0.95*** |
| | 6 | <i>α-TUB</i> | 0.17 | <i>α-TUB</i> | 0.082 | <i>ELF-4A</i> | 0.94*** |
| | 7 | <i>DNAJ</i> | 0.18 | <i>ACT</i> | 0.083 | <i>EF-1A</i> | 0.92*** |
| | 8 | <i>EF-1A</i> | 0.18 | <i>MDH</i> | 0.084 | <i>GAPDH</i> | 0.91*** |
| | 9 | <i>MDH</i> | 0.19 | <i>S15</i> | 0.086 | <i>CYCL</i> | 0.86*** |
| | 10 | <i>CYCL</i> | 0.37 | <i>CYCL</i> | 0.246 | <i>α-TUB</i> | 0.84*** |
| [CO ₂] | 1 | <i>GAPDH</i> | 0.15 | <i>GAPDH</i> | 0.019 | <i>CAS15</i> | 1.00*** |
| | 2 | <i>UBQ2</i> | 0.16 | <i>ELF-4A</i> | 0.030 | <i>ACT</i> | 0.99*** |
| | 3 | <i>ELF-4A</i> | 0.17 | <i>UBQ2</i> | 0.036 | <i>MDH</i> | 0.99*** |
| | 4 | <i>S15</i> | 0.18 | <i>S15</i> | 0.070 | <i>ELF-4A</i> | 0.98*** |
| | 5 | <i>α-TUB</i> | 0.18 | <i>EF-1A</i> | 0.076 | <i>UBQ2</i> | 0.98*** |
| | 6 | <i>ACT</i> | 0.19 | <i>α-TUB</i> | 0.077 | <i>GAPDH</i> | 0.97*** |
| | 7 | <i>EF-1A</i> | 0.19 | <i>ACT</i> | 0.082 | <i>DNAJ</i> | 0.94** |
| | 8 | <i>MDH</i> | 0.23 | <i>MDH</i> | 0.105 | <i>α-TUB</i> | 0.91* |
| | 9 | <i>DNAJ</i> | 0.31 | <i>DNAJ</i> | 0.180 | <i>EF-1A</i> | 0.91* |
| | 10 | <i>CYCL</i> | 0.53 | <i>CYCL</i> | 0.357 | <i>CYCL</i> | 0.47 ^{ns} |
| Multiple stress | 1 | <i>GAPDH</i> | 0.16 | <i>ELF-4A</i> | 0.028 | <i>MDH</i> | 0.97*** |
| | 2 | <i>ELF-4A</i> | 0.16 | <i>UBQ2</i> | 0.053 | <i>DNAJ</i> | 0.96*** |
| | 3 | <i>α-TUB</i> | 0.17 | <i>α-TUB</i> | 0.060 | <i>S15</i> | 0.96*** |
| | 4 | <i>ACT</i> | 0.18 | <i>GAPDH</i> | 0.062 | <i>ELF-4A</i> | 0.96*** |
| | 5 | <i>UBQ2</i> | 0.18 | <i>DNAJ</i> | 0.074 | <i>ACT</i> | 0.95*** |
| | 6 | <i>S15</i> | 0.18 | <i>ACT</i> | 0.077 | <i>EF-1A</i> | 0.90*** |
| | 7 | <i>DNAJ</i> | 0.20 | <i>S15</i> | 0.082 | <i>UBQ2</i> | 0.90*** |

Continued from table 4 on next page

| | | | | | | | |
|---------------------|-----------|---------------|------|---------------|-------|---------------|---------|
| | 8 | <i>MDH</i> | 0.21 | <i>MDH</i> | 0.094 | <i>GAPDH</i> | 0.88*** |
| | 9 | <i>EF-1A</i> | 0.27 | <i>EF-1A</i> | 0.164 | <i>CYCL</i> | 0.83*** |
| | 10 | <i>CYCL</i> | 0.43 | <i>CYCL</i> | 0.288 | <i>α-TUB</i> | 0.50* |
| Total stress | 1 | <i>GAPDH</i> | 0.16 | <i>ELF-4A</i> | 0.040 | <i>MDH</i> | 0.97*** |
| | 2 | <i>UBQ2</i> | 0.18 | <i>UBQ2</i> | 0.044 | <i>S15</i> | 0.96*** |
| | 3 | <i>ELF-4A</i> | 0.18 | <i>GAPDH</i> | 0.055 | <i>ELF-4A</i> | 0.95*** |
| | 4 | <i>S15</i> | 0.19 | <i>S15</i> | 0.085 | <i>ACT</i> | 0.95*** |
| | 5 | <i>ACT</i> | 0.19 | <i>ACT</i> | 0.095 | <i>DNAJ</i> | 0.94*** |
| | 6 | <i>α-TUB</i> | 0.22 | <i>DNAJ</i> | 0.105 | <i>UBQ2</i> | 0.93*** |
| | 7 | <i>DNAJ</i> | 0.23 | <i>MDH</i> | 0.111 | <i>GAPDH</i> | 0.92*** |
| | 8 | <i>MDH</i> | 0.23 | <i>α-TUB</i> | 0.112 | <i>CYCL</i> | 0.82*** |
| | 9 | <i>EF-1A</i> | 0.24 | <i>EF-1A</i> | 0.123 | <i>EF-1A</i> | 0.79*** |
| | 10 | <i>CYCL</i> | 0.44 | <i>CYCL</i> | 0.295 | <i>α-TUB</i> | 0.73*** |

The consensus ranking obtained with RefFinder (Table 5), classified *MDH* as the most stable gene for all comparison groups, therefore constituting a good choice for the studies of *Coffea* spp. under future estimated conditions of increased [CO₂] and temperature. Furthermore, *ACT* and *S15* were always ranked in the top five positions, while *α-TUB* and *CYCL* were amongst the least stable genes, as previously found in previous tests (Tables 3 and 4).

Table 5 - Overall ranking of the most stable genes within each treatment made through RefFinder program, considering the variables genotype, temperature, [CO₂] and their interaction.

| Genotypes | | Temperature | | [CO ₂] | | Multiple stress | | Total stress | |
|---------------|-------|---------------|-------|--------------------|------|-----------------|------|---------------|------|
| <i>MDH</i> | 1.68 | <i>MDH</i> | 1.86 | <i>MDH</i> | 1.68 | <i>MDH</i> | 1.41 | <i>MDH</i> | 1.41 |
| <i>S15</i> | 1.86 | <i>UBQ2</i> | 1.86 | <i>S15</i> | 1.78 | <i>ELF-4A</i> | 2.21 | <i>ACT</i> | 1.57 |
| <i>ACT</i> | 2.99 | <i>DNAJ</i> | 2.11 | <i>UBQ2</i> | 2.71 | <i>DNAJ</i> | 2.63 | <i>S15</i> | 2.78 |
| <i>DNAJ</i> | 3.34 | <i>ACT</i> | 3.46 | <i>ACT</i> | 2.83 | <i>S15</i> | 2.78 | <i>DNAJ</i> | 3.94 |
| <i>ELF-4A</i> | 3.83 | <i>S15</i> | 3.98 | <i>ELF-4A</i> | 4.40 | <i>ACT</i> | 4.40 | <i>ELF-4A</i> | 4.95 |
| <i>UBQE2</i> | 5.05 | <i>ELF-4A</i> | 6.24 | <i>GAPDH</i> | 6.82 | <i>GAPDH</i> | 6.64 | <i>UBQ2</i> | 5.05 |
| <i>GAPDH</i> | 7.00 | <i>GAPDH</i> | 6.74 | <i>EF-1A</i> | 7.00 | <i>UBQ2</i> | 6.74 | <i>GAPDH</i> | 7.00 |
| <i>CYCL</i> | 8.00 | <i>EF-1A</i> | 8.24 | <i>α-TUB</i> | 8.00 | <i>CYCL</i> | 8.00 | <i>CYCL</i> | 8.00 |
| <i>EF-1A</i> | 9.00 | <i>CYCL</i> | 8.74 | <i>CYCL</i> | 8.80 | <i>EF-1A</i> | 9.15 | <i>α-TUB</i> | 9.24 |
| <i>α-TUB</i> | 10.00 | <i>α-TUB</i> | 10.00 | <i>DNAJ</i> | 9.00 | <i>α-TUB</i> | 9.24 | <i>EF-1A</i> | 9.74 |

MDH and *ACT* have been previously described as being amongst the most

stable reference genes for qRT-PCR studies in *Coffea* spp. subjected to N starvation, salt and heat stresses (Carvalho et al., 2013) and to cold and drought stresses (Goulao et al., 2012), respectively. However, there was no consensus for the majority of candidate reference genes, *i.e.*, the expression stability strongly varied according to the environmental stressful condition, again highlighting the importance of a proper and accurate selection of reference genes for each single experimental condition.

For all comparison groups at V2/V3 the Pairwise variation (V) value was already below 0.15 (Figure 2), indicating that the use of two genes guarantee a strong accuracy for the normalization of qRT-PCR data. It is noteworthy to mention that for all treatments the pairwise variation values were <0.10 (except for the use of just one reference gene), indicating low expression instability of the selected genes tested for these environmental conditions.

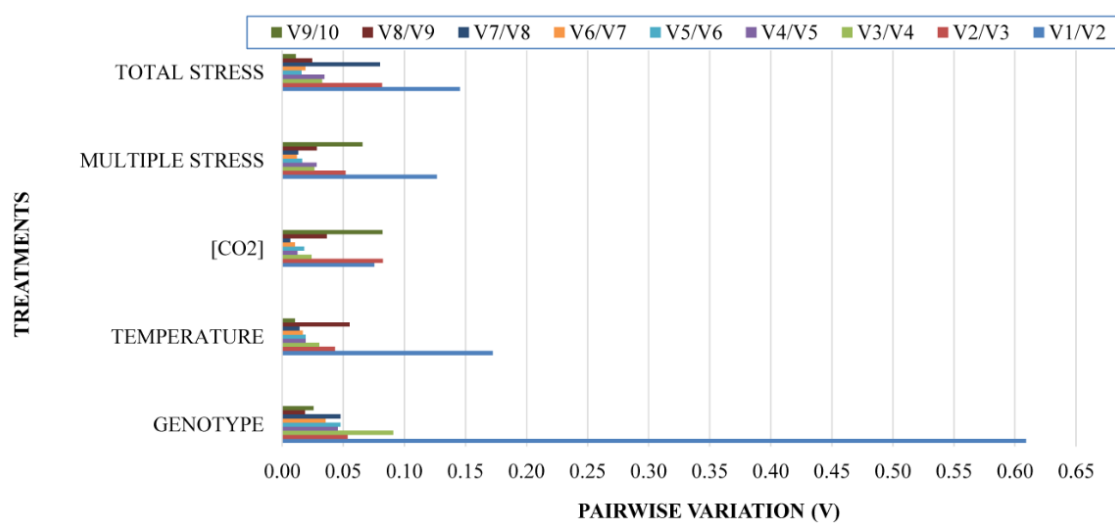


Figure 2 - Pairwise variation analysis to determine the optimal number of reference genes for qRT-PCR data normalization.

In order to validate the consensus ranking, we have examined the relative expression of *RLS*, encoding the large-subunit of RuBisCO. The choice of this enzyme was related to its central role in the C-assimilation pathway, considering that improved crop photosynthetic efficiency under high temperature might be achieved through the replacement of a number of candidate amino acid substitutions to improve RuBisCO performance (Orr et al., 2016). Moreover, the

RLS gene was selected based on the fact that, according to structural-functional analyses, most of the important amino acid residues necessary for catalysis are present in the large subunits (Morita et al. 2014). The consensus ranking established by RefFinder identified *MDH*, *UBQ2* and *DNAJ* as the best stable genes to temperature, whereas *α -TUB*, *CYCL* and *EF-1A* were the least stable ones. Given that the increase in atmospheric temperature has proven to be the most disturbing variable to metabolism performance, mineral nutrition and acclimation limitation under predicted future environmental conditions (Martins et al., 2014; 2016; Rodrigues et al., 2016), with particular strong negative implications to RuBisCO catalytic ability (Rodrigues et al., 2016), we decided to use the most/least stable genes to temperature for *RLS* validation.

The expression profiles were normalized with the two and three most and least stable genes (Tables 6 and 7), being observed that the expression patterns of *RLS* varied with the comparison group. Noticeably, due to the high SD of Ct values in many cases variations in *RLS* expression along the stress imposition were not reported as statistically significant. The patterns of *RLS* expression were nearly the same in qRT-PCR reactions calibrated with two or three genes. Independently of the reference gene stability, increase in temperature generally resulted in up-regulation of *RLS* expression at standard [CO₂] of 380 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ in all genotypes, except in IPR108 at 31/25°C and 37/30°C where *RLS* expression was nearly the same as the control. For the 700 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ comparison group, the use of the most stable reference genes produced different results from those obtained with the least stable genes at 25/20°C and 31/25°C. Thus, when reactions were normalized with the most stable genes, a consistent decrease in the transcriptional activity of *RLS* was observed at these temperatures in all genotypes, while the use of the least stable genes indicated a positive regulation of *RLS* expression. For 37/30°C and 42/34°C, normalization of qRT-PCR with the most or the least stable genes produced similar up-regulated expression patterns of *RLS*. Notably, such an up-regulation occurred when RuBisCO activity began to decrease (37/30°C) or was severely depressed (42/34°C) (Rodrigues et al., 2016). Such apparent discrepancy was also noted in chloroplastic ascorbate peroxidase (APX). APX activity was the most reduced (to about 10% of the control) at 42/34°C among the studied enzymes, contrasting to the largest increase in the

transcriptional activity of the APX gene amongst all studied genes (Martins et al., 2016). Such large increases in gene transcripts may be related to an attempt of the plants to compensate the severe decline of enzyme activity, and further highlights the need of integrated experiments that include gene expression and enzyme activity studies.

Table 6 - Analysis of *RLS* expression analysis by qRT-PCR, calibrated with the two most (*MDH* and *UBQ2*) and the two least (*a-TUB* and *CYCL*) genes for the temperature group/treatment. Significance is indicated as: ** P < 0.001; P < 0.01 * P < 0.05 ns = not significant.

| Genotype | Reference genes | | <i>MDH</i> and <i>UBQ2</i> | <i>a-TUB</i> and <i>CYCL</i> | |
|----------|-----------------|--------------------|----------------------------|------------------------------|-------|
| | Temperature | [CO ₂] | <i>RLS</i> expression | <i>RLS</i> expression | |
| CL 153 | 25/20°C | 380 | 1.00 | 1.00 | |
| | | 700 | 0.361 | 1.768 | |
| | 31/25°C | 380 | 1.353 | 5.665 | |
| | | 700 | 0.504 | 3.559 | |
| | 37/30 °C | 380 | 1.581 | 12.556 | |
| | | 700 | 1.467 | 12.86 | |
| | 42/34°C | 380 | 4.565 | 25.922 | |
| | | 700 | 8.889 | 25.114 | |
| | Icatu | 25/20°C | 380 | 1.00 | 1.00 |
| | | | 700 | 0.781 | 1.553 |
| 31/25°C | | 380 | 1.900** | 3.604* | |
| | | 700 | 1.505 | 2.546* | |
| 37/30 °C | | 380 | 3.423* | 6.957* | |
| | | 700 | 2.776* | 5.742* | |
| 42/34°C | | 380 | 5.220* | 19.923* | |
| | | 700 | 7.097* | 32.153* | |
| IPR 108 | | 25/20°C | 380 | 1.00 | 1.00 |
| | | | 700 | 0.249* | 0.603 |
| | 31/25°C | 380 | 0.778 | 1.345 | |
| | | 700 | 0.801* | 1.720* | |
| | 37/30 °C | 380 | 0.844 | 1.851*** | |
| | | 700 | 1.070 | 2.172 | |
| | 42/34°C | 380 | 4.940* | 21.732** | |
| | | 700 | 1.399 | 4.01 | |

Table 7 - Analysis of *RLS* expression by qRT-PCR, calibrated with the three most (*MDH*, *UBQ2* and *DNAJ*) and the three least (*a-TUB*, *CYCL* and *EF-1A*) genes for the temperature group/treatment. Significance is indicated as: ** $P < 0.00$; * $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ns = not-significant.

| Reference genes | | | <i>MDH, UBQ2 and DNAJ</i> | <i>a-TUB, CYCL and EF-1A</i> | |
|-----------------|-------------|--------------------|---------------------------|------------------------------|---------|
| Genotype | Temperature | [CO ₂] | <i>RLS expression</i> | <i>RLS expression</i> | |
| CL 153 | 25/20°C | 380 | 1.00 | 1.00 | |
| | | 700 | 0.410 | 1.347 | |
| | 31/25°C | 380 | 1.424 | 2.780 | |
| | | 700 | 0.522 | 1.747 | |
| | 37/30 °C | 380 | 1730 | 5.701 | |
| | | 700 | 1.435 | 6.357 | |
| | 42/34°C | 380 | 4.214 | 10.853 | |
| | | 700 | 6.527 | 10.782 | |
| | Icatu | 25/20°C | 380 | 1.00 | 1.00 |
| | | | 700 | 0.744 | 1.449 |
| | | 31/25°C | 380 | 1.608* | 2.807** |
| | | | 700 | 1.215 | 2.170* |
| 37/30 °C | | 380 | 2.726* | 5.250* | |
| | | 700 | 2.219* | 3.955* | |
| 42/34°C | | 380 | 4.087* | 9.637* | |
| | | 700 | 5.389* | 12.979* | |
| IPR 108 | | 25/20°C | 380 | 1.00 | 1.00 |
| | | | 700 | 0.249* | 1.059 |
| | | 31/25°C | 380 | 0.697* | 1.307* |
| | | | 700 | 1.123 | 2.865* |
| | 37/30 °C | 380 | 0.759 | 1.495 | |
| | | 700 | 1.093 | 3.453 | |
| | 42/34°C | 380 | 4.950* | 11.012* | |
| | | 700 | 1.759 | 4.645 | |

Given the facts described above, the reference genes used in this study were quite stable under the applied experimental conditions, as pairwise variation values were < 0.10 . The results obtained in the groups 700-25/20°C and 700-31/25°C call up for the importance to select the best reference genes. Altogether, despite the low instability of *a-TUB*, *CYCL* and *EF-1A*, the use of high-stability reference genes is the best option for the correct interpretation of data from transcriptional studies (Kozera and Rapacz, 2013; Roy et al., 2011). Also importantly, this corroborates with previous studies in *Coffea spp.*, which indicate that the selection of reference genes for an accurate qRT-PCR normalization should be according to each for

specific condition (Cruz et al., 2009; Goulao et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Yuyama et al., 2016).

4. Conclusions

In summary, our study reinforces the importance of the *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE) guidelines (Bustin et al., 2010) to normalize qRT-PCR data. The consensus ranking obtained with RefFinder showed that the stability of the studied reference candidate genes changed according to the conditions/interactions, although MDH was the best one in all treatments, therefore, constituting a good common basis for qRT-PCR data normalization.

However, the Pairwise variation analysis showed the need to use two reference genes, with the second most stable gene changing according the conditions: *S15* for genotype and [CO₂], *UBQ2* for temperature, *EJF-4A* for multiple stress, and *ACT* for multiple stress. Using the expression profiles of coffee *RLS*, results from the *in silico* aggregation and experimental validation confirmed that the use of two reference genes is an adequate procedure to normalize qRT-PCR data.

Altogether, this work highlights the importance of an adequate selection of reference genes for each single or combined environmental conditions in *Coffea* spp. Furthermore, it constitutes the basis to accurately study molecular responses of *Coffea* spp. in a context of future climate changes, with expected relevant increases in atmospheric [CO₂] together with a global warming.

Acknowledgements

The authors would like to thank DELTA Cafés (Portugal) for technical assistance, and Profs. T. Sera (IAPAR) for supplying IPR108 material. Thanks are also due to M. Costa, and N. Duro, for technical help. To CAPES by the subscript in PDSE: 0343 / 2014-05, M.Q. Martins.

5. References

- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245-5250, 2004.
- ARTICO, S.; NARDELI, S.M.; BRILHANTE, O.; GROSSI-DE-SA, M.F.; ALVES-FERREIRA, M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biol.* 10(49), 2010.
- BUNN, C.; LÄDERACH, P.; OVALLE-RIVERA, O.; KIRSCHKE, D. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Clim. Change* ,129, 89-101, 2015.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622, 2009.
- CARVALHO, K.; BESPALHOK FILHO, J.C.; DOS SANTOS, T.B.; DE SOUZA, S.G.; VIEIRA, L.G.; PEREIRA, L.F.; DOMINGUES, D.S. Nitrogen starvation, salt and heat stress in coffee (*Coffea arabica* L.): Identification and validation of new genes for qPCR normalization. *Mol. Biotechnol.* 53, 315-325, 2013.
- DA COSTA, M.; DURO, N.; BATISTA-SANTOS, P.; RAMALHO, J.C.; RIBEIRO-BARROS, A.I. Validation of candidate reference genes for qRT-PCR studies in symbiotic and non-symbiotic *Casuarina glauca* Sieb. ex Spreng. under salinity conditions. *Symbiosis.* 66, 21-35, 2015.
- CRUZ, F., KALAOUN, S., NOBILE, P., COLOMBO, C., ALMEIDA, J., BARROS, L., ROMANO, E., GROSSI-DE-SÁ, M., VASLIN, M., AND ALVES-FERREIRA, M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Mol. Breed.* 23, 607-616, 2009.
- CSEKE, L.J.; TSAI, C.-J.; ROGERS, A.; NELSEN, M.P.; WHITE, H.L.; KARNOSKY, D.F.; PODILA, G.K. Transcriptomic comparison in the leaves of two aspen genotypes having similar carbon assimilation rates but different partitioning patterns under elevated [CO₂]. *New Phytol.* 182, 891-911, 2009.
- DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review. *Theor. Exp. Plant Physiol. (ex-Braz. J. Plant Physiol.)*. 18, 55-81, 2006.
- DAMATTA, F.M.; GODOY, A.G.; MENEZES-SILVA, P.E.; MARTINS, S.C.V.; SANGLARD, L.M.V.P.; MORAIS, L.E.; TORRE-NETO, A.; GHINI, R. Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *J. Exp. Bot.* 67, 341-352, 2016.
- DIE, J.V.; ROMÁN, B.; NADAL, S.; GONZÁLEZ-VERDEJO, C.I. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta.* 232, 145-153, 2010.
- EL KELISH, A.; ZHAO, F.; HELLER, W.; DURNER, J.; WINKLER, J.B.; BEHREND, H.; TRIDL-HOFFMANN, C.; HORRES, R.; PFEIFER, M.; FRANK, U.; ERNST, D. Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen allergenicity: SuperSAGE transcriptomic analysis upon elevated CO₂ and drought stress. *BMC Plant Biol.* 14(176), 2014.
- GHINI, R.; TORRE-NETO, A.; DENTZIEN, A.F.M.; GUERREIRO-FILHO, O.;

- LOST, R.; PATRÍCIO, F.R.A.; PRADO, J.S.M.; THOMAZIELLO, R.A.; BETTIOL, W.; DAMATTA, F.M. Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO₂ enrichment. *Climatic Change*. 132, 307-320, 2015.
- GOULAO, L.F.; FORTUNATO, A.S.; RAMALHO, J.C. Selection of reference genes for normalizing quantitative real-time PCR gene expression data with multiple variables in *Coffea* spp. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30, 741-759, 2012.
- GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; GUENIN, S.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, J.-F.; LOUVET, R.; RUSTERUCCI, C.; MORITZ, T.; GUERINEAU, F.; BELLINI, C.; VAN WUYTSWINKEL, O. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotech. J.* 6, 609-618, 2008b.
- GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; BELLINI, C.; VAN WUYTSWINKEL, O. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *Plant Cell* 20, 1734-1735, 2008a.
- ICO (2014a). Trade statistics. Available at: http://www.ico.org/trade_statistics.asp. Access, July 2016.
- ICO (2014b). World coffee trade (1963–2013): A review of the markets, challenges and opportunities facing the sector. ICC (International Coffee Council), 111-5 Rev. 1, 29p. Available at: http://www.ico.org/show_news.asp?id=361. Access, July 2016.
- IMAI, T.; UBI, B.E.; SAITO, T.; MORIGUCHI, T. Evaluation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* using different tissue samples and seasonal conditions. *PLoS ONE*. 9(e86492), 2014.
- IPCC (2013). Climate change 2013: The physical science basis. Summary for policymakers, technical summary and frequent asked questions. Part of the working group I contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. TF Stocker, D Qin, G-K Plattner, MMB Tignor, SK Allen, J Boschung, A Nauels, Y Xia, V Bex, PM Midgley (eds.). Intergovernmental Panel on Climate Change, p. 203. ISBN 978-92-9169-138-8.
- IPCC (2014). Climate change 2014: Mitigation of climate change. Contribution of working group III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, O Edenhofer, R Pichs-Madruga, Y Sokona, E Farahani, S Kadner, K Seyboth, A Adler, I Baum, S Brunner, P Eickemeier, B Kriemann, J Savolainen, S Schlömer, C von Stechow, T Zwickel, JC Minx (eds). Cambridge, Cambridge University Press, UK and New York, USA, p. 1435. ISBN 978-1-107-65481-5.
- KIBBE, W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucl. Acids Res.* 35, W43-W46, 2007.
- KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. *J. Applied Gen.* 54, 391-406, 2013.
- LI, M.Y.; WANG, F.; JIANG, Q.; WANG, G.L.; TIAN, C.; XIONG, A.S. Validation and comparison of reference genes for qPCR normalization of celery (*Apium graveolens*) at different development stages. *Front. Plant Sci.* 7(313), 2016.
- LLANOS, A.; FRANÇOIS, J.M.; PARROU, J.L. Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. *BMC Gen.* 16, art. 71, 2015.
- MAGRACH, A., GHAZOUL, J. Climate and pest-driven geographic shifts in global coffee production: Implications for forest cover, biodiversity and carbon storage. *PLoS ONE*. 10, art. e0133071, 2015.
- MALLONA, I.; LISCHEWSKI, S.; WEISS, J.; HAUSE, B.; EGEEA-CORTINES, M.

- Validation of reference genes for quantitative realtime PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*, BMC Plant Biol. 10, art. 4, 2010.
- MARTINS, L.D.; TOMAZ, M.A.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO J.C. Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. Clim. Change. 126, 365-379, 2014.
- MARTINS, M.Q.; RODRIGUES, W.P.; FORTUNATO, A.S.; LEITÃO, A.E.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SILVA, M.J.; REBOREDO, F.H.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO J.C. Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *Coffea* spp. Front. Plant Sci. 7, art. 947, 2016.
- Mondego, J.M., Vidal, R.O., Carazzolle, M.F., Tokuda, E.K., Parizzi, L.P., COSTA, G.G.; PEREIRA, L.F.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. BMC Plant Biol. 11, art. 30, 2011.
- MORITA, K.; HATANAKA, T.; MISOO, S.; FUKAYAMA, H. Unusual small subunit that is not expressed in photosynthetic cells alters the catalytic properties of rubisco in rice. Plant Physiol. 164, 69-79, 2014.
- NIU, X.; QI, J.; ZHANG, G.; XU, J.; TAO, A.; FANG, P.; SU, J. Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR gene expression analysis in Jute (*Corchorus capsularis*) under stress treatments. Front. Plant Sci. 6, art. 848, 2015.
- ORR, D.J.; ALCÂNTARA, A.; KAPRALOV, M.V.; ANDRALOJC, P.J.; CARMO-SILVA, E.; PARRY, M.A.J. Surveying rubisco diversity and temperature response to improve crop photosynthetic efficiency. Plant Physiol. 172, 707-717, 2016.
- PETRICCIONE, M.; MASTROBUONI, F.; ZAMPELLA, L.; SCORTICHINI, M. Reference gene selection for normalization of RT-qPCR gene expression data from *Actinidia deliciosa* leaves infected with *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Sci. Rep. 5, art. 16961, 2015.
- PFÄFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol. Lett. 26, 509-515, 2004.
- PONCET, V.; RONDEAU, M.; TRANCHANT, C.; CAYREL, A.; HAMON, S.; DE KOCHKO, A.; HAMON, P. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. Mol. Genet. Genomics. 276, 436-449, 2006.
- R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. Accessed on November 2016.
- RAMALHO, J.C.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SIMÕES-COSTA, M.C.; LEITÃO, A.E.; FORTUNATO, A.S.; BATISTA-SANTOS, P.; PALOS, I.M.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M. Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. PLoS ONE. 8, art. e82712, 2013.
- RODRIGUES, W.P.; MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.S.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; SIMÕES-COSTA, M.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; COLWELL, F.; GOULAO, L.; MÁGUAS, C.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO J.C. Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and

- mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Global Change Biol.* 22, 415-431, 2016.
- ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Krawetz S, Misener S (eds), Humana: Totowa, Chapter 20, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, p.365-386, 2000.
- ROY, S.J.; TUCKER, E.J.; TESTER, M. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Cur. Op. Plant Biol.* 14, 232-239, 2011.
- TIAN, C.; JIANG, Q.; WANG, F.; WANG, G.L.; XU, Z.S.; XIONG, A.S. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. *PLoS ONE.* 10, art. e0117569, 2015.
- YAN, X.; DONG, X.; ZHANG, W.; YIN, H.; XIAO, H.; CHEN, P.; MA, X.-F. Reference gene selection for quantitative Real-Time PCR normalization in *Reaumuria soongorica*. *PLoS ONE.* 9, art. e104124, 2014.
- YANG, C.; PAN, H.; NOLAND, J.E.; ZHANG, D.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; ZHOU, X. Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in a predatory biological control agent, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Sci. Rep.* 5, art. 18201, 2015.
- YE, X.; ZHANG, F.; TAO, Y.; SONG, S.; FANG, J. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in different cherry genotypes, developmental stages and organs. *Sci. Hortic.* 181, 182-188, 2015.
- YUYAMA, P.M.; REIS JÚNIOR, O.; IVAMOTO, S.T.; DOMINGUES, D.S.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.; CHARMETANT, P.; LEROY, T.; PEREIRA, L.F. Transcriptome analysis in *Coffea eugenioides*, an Arabica coffee ancestor, reveals differentially expressed genes in leaves and fruits. *Mol. Genet. Genomics.* 291, 323-336, 2016.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.1-0034.11, 2002.
- VIDAL, R.O.; MONDEGO, J.M.C.; POT, D.; AMBRÓSIO, A.B.; ANDRADE, A.C.; PEREIRA, L.F.P.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA G.A.G. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species Expressed Sequence Tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. *Plant Physiol.* 154, 1053-1066, 2010.
- VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.A.H.; METHA, A.; OLIVEIRA, A.C.; LABATE, C.A.; MARINO, C.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MONTE, D.C. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Theor. Exp. Plant Physiol. (ex-Braz. J. Plant Physiol.)* 18, 95-108, 2006.
- WALLER, J.M.; BIGGER, M.; HILLOCKS, R.J. Coffee pests, diseases and their management, in *World Coffee Production*, eds J. M. Waller, M. Bigger and R.J. Hillocks (Wallingford: CAB International, Egham, Surrey, UK.) Chapter 2, 17-40, 2007.
- WANG, G.L.; TIAN, C.; JIANG, Q.; XU, Z.S.; WANG, F.; XIONG, A.S. Comparison of nine reference genes for real-time quantitative PCR in roots and leaves during five developmental stages in carrot (*Daucus carota* L.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 91, 264-270, 2016.
- WATANABE, C.K.; SATO, S.; YANAGISAWA, S.; UESONO, Y.; TERASHIMA, I.; NOGUCHI, K. Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and

transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: Possible relationships with respiratory rates. *Plant Cell Physiol.* 55, 341-357, 2014.

WILLEMS, E.; LEYNS, L.; VANDESOMPELE, J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal. Biochem.* 379, 127-129, 2008.

XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* 80, 75-84, 2012.

Capítulo 3

Crescimento vegetativo de 28 genótipos de *Coffea canephora* cultivados a 750 metros de altitude

Resumo - Plantas de *Coffea canephora* cultivadas em baixas temperaturas, sofrem alterações nos processos fotossintéticos, com reflexo direto no crescimento. No entanto, essa espécie possui plantas com distintos mecanismos de tolerância a baixas temperaturas, graças a sua grande diversidade genética. O objetivo deste estudo foi de avaliar as taxas de crescimento de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos em 28 materiais genéticos de *C. canephora* cultivados em 750 m de altitude. O experimento foi realizado em Morrinhos, estado de Goiás - Brasil. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco plantas. O período de avaliação do experimento foi de 23/01/2013 à 07/07/2013. Ramos ortotrópicos e plagiotrópicos selecionados e etiquetados foram quinzenalmente avaliados quanto ao seu comprimento (cm), sendo avaliadas as taxas de crescimento. O resultados obtidos foram relacionados com os fatores climáticos ocorridos durante o período da experimentação. Os materiais genéticos de *C. canephora* avaliados neste estudo apresentam diversidade genética para as características taxa de crescimento de ramos ortotrópicos e taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos, tornando-se possível a seleção de genótipos com potencial de cultivo a 750 m de altitude. Em geral os genótipos de *C. canephora* avaliados neste estudo, apresentaram variações nas taxas de crescimento, em resposta principalmente a mudanças na temperatura, observando-se queda brusca e constante das taxas de crescimento entre o período de 08/04/2013 à 23/05/2013, época na qual as temperaturas registradas foram sempre abaixo de 16,83°C.

Abstract - *Coffea canephora* plants grown at low temperatures, undergo changes in the photosynthetic processes, with a direct impact on growth. However, this species has plants with distinct mechanisms of tolerance to low temperatures, thanks to its great genetic diversity. The objective of this study was to evaluate the growth rates of orthotropic and plagiotropic branches of 28 *C. canephora* genetic material grown at 750 meters. The experiment was conducted in Morrinhos, Goiás State - Brazil. The design was a randomized complete block design with four replications, each replication consisted of five plants. The evaluation period of the experiment was from 01/23/2013 to 07/07/2013. Branches orthotropic and plagiotropic selected and labeled, were evaluated every two weeks to its length (cm), and evaluated the growth rates. The results were related to climatic factors that occurred during the trial period. Genetic material *C. canephora* evaluated in this study have genetic diversity to the characteristics growth rate of orthotropic branches and growth rate of plagiotropic branches, making it possible to select genotypes with potential for cultivation to 750 m altitude. In general, the genotypes of *C. canephora* evaluated in this study, showed variations in growth rates, accordance with climate change, being observed sharp and steady decline in growth rates for the period from 08/04/2013 to 23/05/2013 season in which the logged temperatures were always below 16.83°C.

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (ICO, 2016). Na safra de 2015, o café conilon foi responsável por 26% dentro do total de 43.235,00 mil sacas de café beneficiado (CONAB, 2017). O gênero *Coffea* inclui pelo menos 124 espécies, das quais *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner são responsáveis por cerca de 99% da produção mundial de café (DAVIS et al., 2012). Considera-se que o melhor crescimento vegetativo é observado em temperaturas médias anuais na faixa de 19 a 23°C, para *C. arabica*, de 22 a 26°C para *C. canephora* (DaMATTA; RAMALHO, 2006; MATIELLO et al., 2010). Para *C. canephora* cv. Conilon a maior taxa de crescimento é observada quando a temperatura média mínima anual registra-se acima de 17°C, a temperatura média máxima anual abaixo de 31°C e a temperatura média anual entre 21 e 27,5°C (PARTELLI et al., 2013).

Os modelos de previsão do IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) indicam elevação da temperatura, até entre 3,7 a 4,8°C até 2100, em paralelo a um aumento da frequência de secas prolongadas (IPCC, 2014). Estudos indicam que o aumento da temperatura média global entre 1 e 3°C, pode desabilitar áreas favoráveis ao *C. arabica*. (ASSAD et al., 2004). Previsões do IPCC, indicam grandes alterações no zoneamento agroclimático, envolvendo perda significativa de áreas adequadas ao cultivo de café, em importantes países produtores, como é o caso do Brasil e Vietnã (BUNN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016a). Consequentemente o cultivo de *C. canephora* em áreas de altitude elevada está aumentando ao longo dos anos, visando acima de tudo, o aumento da produtividade e qualidade dos grãos, como é verificado no café arabica (ABREU et al., 2012).

De acordo com Silva et al. (2006), o estado de Goiás, possui temperaturas mínimas inferiores a 17°C durante o inverno, podendo chegar a temperatura mínima de 11°C nos meses mais frios em algumas regiões. Sabe-se que essas condições climáticas podem ser limitantes ao cultivo de *C. canephora*, tendo em vista que estas plantas quando cultivadas em baixas temperaturas, sofrem alterações nos processos fotossintéticos, nomeadamente apresentando diminuição na taxa de fotossíntese líquida e menor eficiência fotossistema II,

acompanhados pela redução da condutância estomática, (ZHU et al., 2008; PARTELLI et al., 2009). No entanto o café conilon apresenta alta diversidade genéticas (FONSECA et al., 2006; FERRÃO et al., 2009; DALCOLMO et al., 2015, COVRE et al., 2016), com as plantas a apresentarem distintos mecanismos de tolerância a baixas temperaturas (BATISTA-SANTOS et al., 2011; PARTELLI et al., 2011; SCOTTI-CAMPOS et al., 2013). Quando expostas a baixas temperaturas, aplicadas gradualmente, *C. canephora* possui mecanismos de defesa que podem permitir diferentes capacidades de aclimatação, o que depende da cultivar (RAMALHO et al., 2014). Recentemente alguns trabalhos vem estudando o cultivo do Conilon em altitude (BARBOSA et al., 2014. RODRIGUES et al., 2016b).

No melhoramento do cafeeiro as características quantitativas são governadas por muitos genes, e neste caso, altamente influenciadas pelo ambiente, assim a expressão genética de cada genótipo avaliado em um determinado local é evidenciada fenotipicamente. Os estudos dessas características podem ser fundamentados em análises de taxas de crescimento de ramos, e esta característica é altamente influenciada pelo fator temperatura (RENA et al., 1994). Assim, propõe-se o teste de cultivo utilizando diferentes genótipos de *C. canephora* em altitude elevada.

Geralmente em programas de melhoramento informações de genótipos são extraídas no intuito de aumentar a credibilidades na tomada de decisão e escolha de materiais genéticos apropriados. Para interpretar melhor essa gama de informações, indica-se a utilização da estatística multivariada, por meio de análises de agrupamentos obtidas por dendrogramas (NETO & MOITA, 1998; FERREIRA et al., 2005; FONSECA et al., 2006; RODRIGUES, et al., 2015).

O objetivo do estudo foi avaliar a variação sazonal da taxa de crescimento de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos de genótipos de *C. canephora* cultivados em altitude elevada.

2. Materiais e métodos

O experimento foi realizado em Morrinhos, Estado de Goiás, Brasil, a cerca de 750 metros. A região de Morrinhos, localizada no estado de Goiás é caracterizada por apresentar um déficit hídrico a partir do mês de abril até o mês de outubro, apresenta topografia plana, relevo ondulado, temperatura mínima variando de 10°C a 20°C nos meses de inversno e temperatura média anual de 20°C. Na figura 1 estão representados os dados climáticos ocorridos durante o ano experimental.

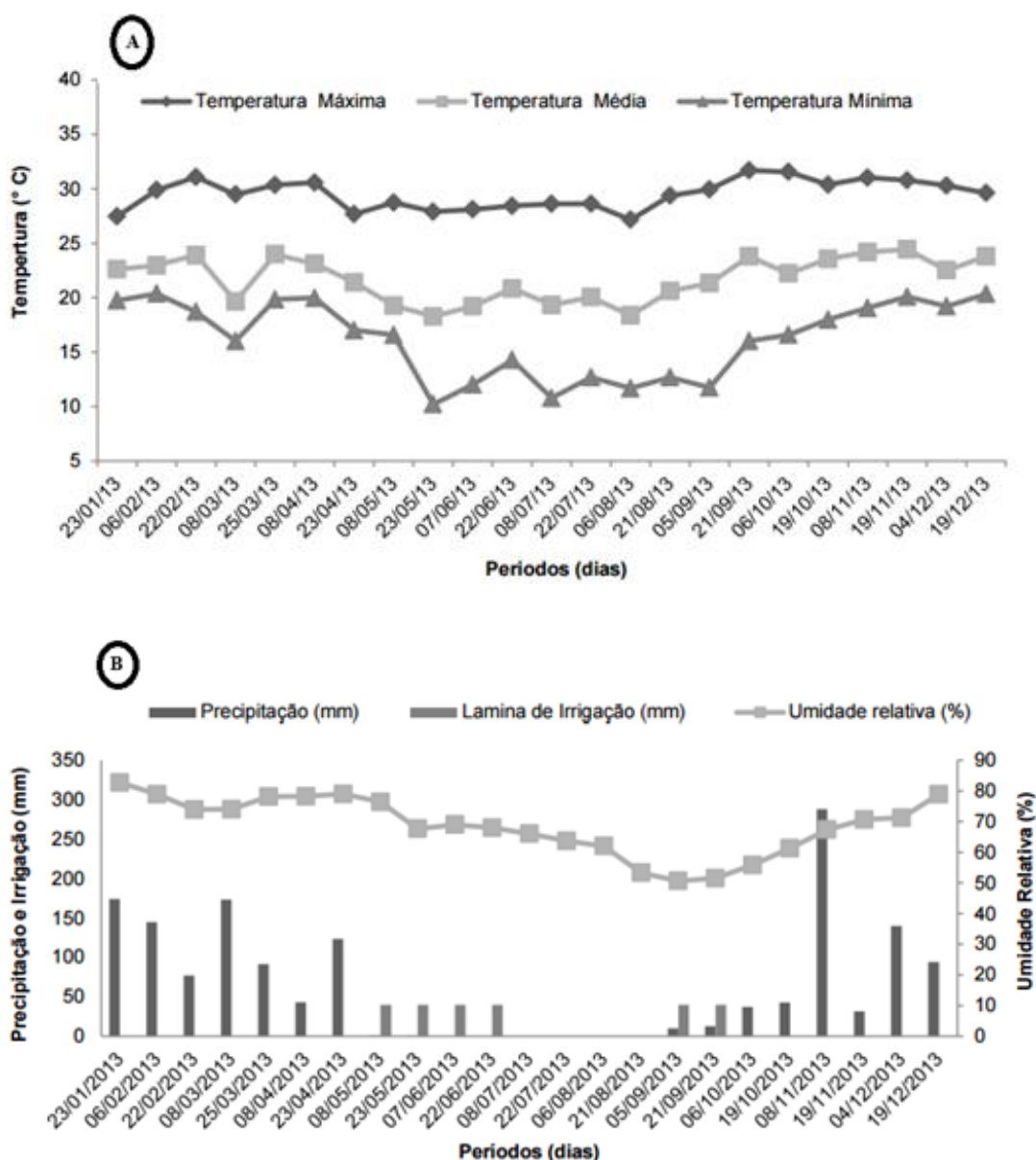


Figura 1 - Temperatura máxima, média e mínima (°C) (A), umidade relativa (%) do ar, precipitação (mm) e lâmina de irrigação (mm) (B) mensurada em experimento de cultivo de 28 genótipos de *C. canephora* em altitude elevada.

Os dados climáticos foram registrados pela estação automática de: A003 em Morrinhos, Goiás. Latitude: 17° 43' S Longitude: 49° 06' W Altitude: 771,42 m. Fonte: INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Para implantar a lavoura experimental foram selecionados 28 genótipos de *C. canephora* (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista dos 28 acessos dos genótipos de *C. canephora* utilizados nesta experimentação, Instituto Federal Goiano, Morrinhos - GO.

| A | CA | A | CA |
|----------|-----------|---|-------------|
| 1V | 1 | NV2 | 14 |
| 2V | 2 | 14 da EMCAPA 8121 (Bragança et al., 2001) | 15 |
| 3V | 3 | Clone 18 | 16 |
| 4V | 4 | NV1 | 17 |
| 5V | 5 | NV8 | 18 |
| 6V | 6 | P1 | 19 |
| 7V | 7 | 3 da EMCAPA 8121 (Bragança et al., 2001) | 20 |
| 8V | 8 | P2 | 21 |
| 9V | 9 | 4 da Bahia | 22 |
| 10V | 10 | NV3 | 23 |
| 11V | 11 | Verdim TA | 24 |
| 12V | 12 | A1 | 25 |
| 13V | 13 | SEMENTES ROBUSTÃO | 26, 27 e 28 |

(**A**): Acessos; (**CA**): Código dos acessos, correspondentes aos 28 genótipos de *C. canephora* analisados neste experimento.

As mudas dos 28 genótipos de *C. canephora* utilizadas no plantio foram produzidas em viveiro certificado pelo MAPA, localizado no município de Marilândia - ES. A lavoura experimental foi implantada no mês de novembro de 2010. O espaçamento utilizado na lavoura experimental foi de 3,5m x 1m, correspondente a distância entre linha e entre plantas, respectivamente, e neste caso ocupando 3,5 m² por planta. Os tratos culturais foram realizados conforme as orientações técnicas para a cultura, inclusive irrigação por gotejamento.

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco plantas (Parcela). Foram realizadas quinzenalmente medidas de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos, na perspectiva de estudar o comportamento das taxas de crescimento dos diferentes genótipos de *C. canephora* averiguadas neste estudo. Para obter a taxa de crescimento do cafeeiro, foram realizadas medidas de comprimento (cm) de ramos plagiotrópicos e ortotrópicos. Foram selecionados ramos novos com cerca de dois pares de

folhas completamente expandidas, sendo os ramos plagiotrópicos, considerados primários e desenvolvidos a partir de ramo ortotrópico. Neste momento, foi escolhido e marcado aleatoriamente um ramo ortotrópico e dois ramos plagiotrópicos em uma planta por parcela. Estes ramos marcados foram alvos das medidas periódicas do início ao fim do estudo.

Após a coleta de dados referente a comprimento (cm) dos ramos ortotrópicos e plagiotrópicos, foi realizado o cálculo da taxa de crescimento (cm dia^{-1}), utilizando a fórmula: $TC = (C_f - C_i)/nd$, onde: TC= taxa de crescimento; C_f = comprimento final; C_i = comprimento inicial e nd = número de dias. Os dados obtidos dos 28 genótipos, foram submetidos à análise de regressão linear. Após, os valores de constante de regressão e coeficientes de regressão obtidos, foram utilizados para formar uma matriz de distância Euclidiana, a qual foi utilizada como fonte de dados para o agrupamento dos genótipos, realizado pelo método (UPGMA) de ligação média (CRUZ et al., 2004). Para formação dos grupos foi calculado um ponto de corte, utilizando a constante de 1,25 tal como sugerido por Milligan & Cooper (1985), utilizando-se a fórmula: $(M+1,25*sd)$, onde: M = média dos valores dos pontos de junção; sd = erro padrão dos valores dos pontos de junção.

Após a formação dos grupos de genótipos, foram averiguadas as taxas de crescimento médio em cada grupo formado, tanto para ramo ortotrópico quanto para ramo plagiotrópico. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico R studio.

3. Resultados e discussão

Na figura 2a apresenta quatro grupos para a característica taxa de crescimento de ramos ortotrópicos. O primeiro grupo foi composto por nove genótipos (22, 13, 25, 7, 11, 14, 20, 1, 16), o segundo grupo composto por nove (17, 5, 8, 26, 12, 27, 23, 3, 21), o terceiro grupo composto por sete (18, 2, 9, 19, 28, 4, 6) e o quarto grupo composto por três (15, 10, 24). Na figura 2b, para taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos também foram formados quatro grupos. No primeiro grupo foram agrupados três genótipos (25, 14, 17), o segundo grupo

foi composto por seis (15, 24, 27, 19, 2, 9), o terceiro grupo composto por sete (23, 4, 16, 3, 13, 1, 22) e o quarto grupo composto por 12 (12, 5, 6, 18, 20, 26, 28, 7, 11, 21, 8, 10).

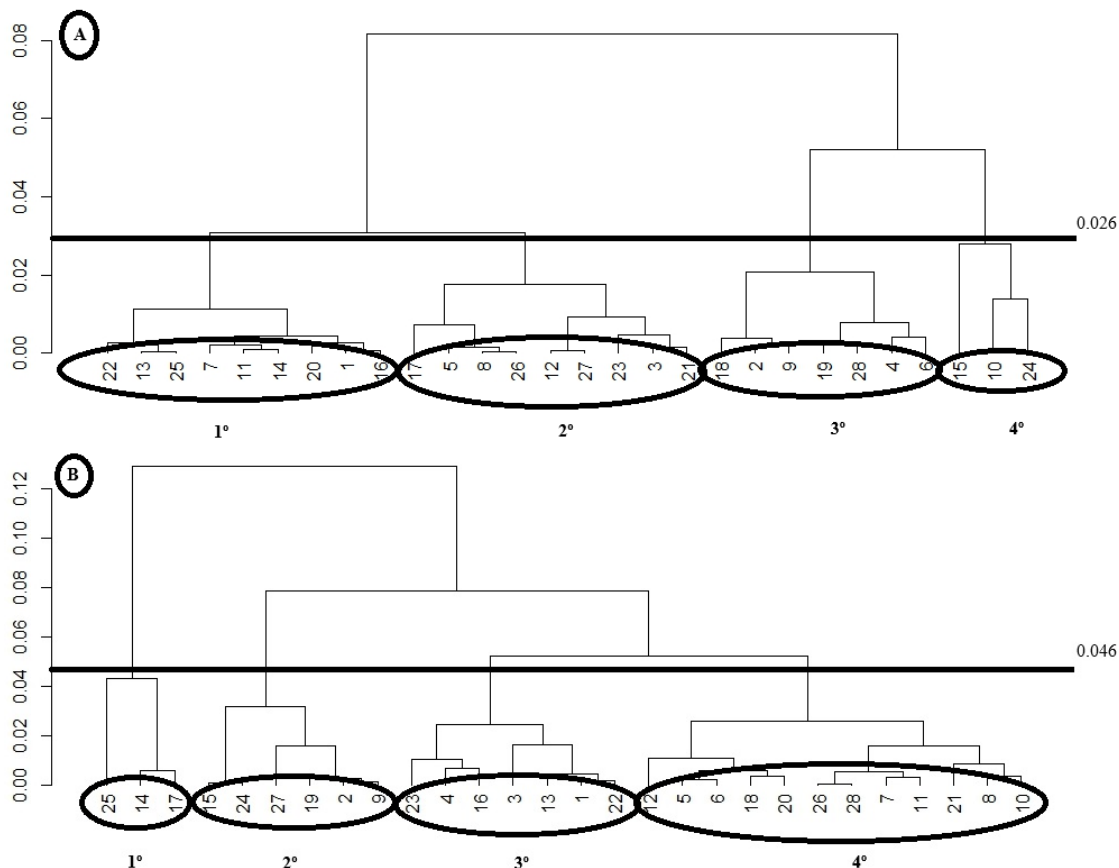


Figura 2 - Dendrogramas construídos para as variáveis taxa de crescimento de ramos ortotrópicos (A) e taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos (B) de 28 genótipos de *C. canephora* cultivados em altitude elevada, a partir da matriz de distância Euclidiana, utilizando ligação média (UPGMA) para o agrupamento.

Nota-se nas características de taxa de crescimento de ramos ortotrópicos e ramos plagiotrópicos (Figura 2), que os grupos formados são distintos quando comparados, indicando que os oito grupos formados devem ser estudados isoladamente. Quanto aos ramos ortotrópicos, houve proximidade entre o terceiro e o quarto grupo (Figura 2a), onde os genótipos possuem valores de taxa de crescimento de ramos ortotrópicos mais próximo, que os demais grupos.

O grau de similaridade entre grupos pode evidenciado pela condição em que os grupos de genótipos assumiram antes de impor um ponto de corte. Se

assumiam os mesmos grupos antes do corte, considera-se o grupo semelhante, mesmo se houver a separação após o corte na árvore de agrupamentos. No caso dos grupos já assumirem elevado grau de distância antes de haver o corte no dendrograma, denomina-se que estes grupos assumem comportamento independente e portanto menos similar quando comparado os demais grupos.

Em geral o melhoramento de plantas envolve estudos de diversas características em diferentes genótipos. Sabe-se que em determinado ambiente, diferentes genótipos revelam fenotipicamente diferentes respostas e ou ajustes (no caso de estresse ambiental). Essas diferenças correspondem a graus de divergência em termos de adaptação, os quais podem ser caracterizados utilizando-se métodos preditivos, que permitem quantificar a variabilidade genética em cafeeiros. Esses métodos fundamentam-se em diferenças morfológicas, fisiológicas ou moleculares entre genitores, que são quantificadas utilizando medidas de dissimilaridade (MURO-ABAD et al., 2005; FREITAS et al., 2009), tais como, a distância euclidiana (ROCHA et al., 2012).

Deve-se considerar que a caracterização de grupos de genótipos é importante, tendo em vista, que envolve a associação de informação de divergência genética analisada pelo desempenho agrônomo no que se refere aos principais componentes de produção. A separação de grupos de genótipos também é importante na iniciativa de obter somar agilidade e precisão nos ganhos em seleções de materiais genéticos, pelo fato de ser conhecida a similaridade entre os genótipos e neste caso direcionar com mais segurança a tomada de decisão no que se refere a escolha do genótipo.

Estratégias eficientes para se utilizar a variabilidade genética são determinantes para o sucesso dos programas de melhoramento do cafeeiro (ROCHA et al., 2013). Segundo Rodrigues et al. (2015), a formação e caracterização de grupos de genótipos são essenciais para orientar na seleção de materiais genéticos em programas de melhoramento, pois permite estabelecer combinações com base no grau de dissimilaridade entre os genótipos, com o objetivo de explorar o potencial necessário para alcançar alto desempenho agrônomo.

Nota-se que tanto para característica ramos ortotrópicos quanto para a característica ramos plagiotrópicos, houve formação de poucos grupos. Neste caso, pode-se considerar que a análise de agrupamento para este estudo foi importante, neste caso a chance de selecionar genótipos semelhantes é alta, propiciando menores ganhos no processo de melhoramento do cafeeiro. Cruz et al. (2004) sugerem o emprego de indivíduos com diferentes padrões de dissimilaridade em programas de melhoramento genético, fugindo à restrição da variabilidade genética e proporcionando maiores ganhos na seleção.

Relacionando os dados climáticos ilustrados na figura 1, com os resultados de taxa de crescimento de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos (Figuras 3 e 4), nota-se resposta diretamente proporcional das taxas de crescimento com as mudanças de temperatura, principalmente as temperaturas mínimas. A medida que as temperaturas mínimas diminuem as taxas de crescimento dos grupos de genótipos de *C. canephora* também diminuem em maior ou menor grau dependendo do grupo de genótipos em questão. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que as taxas de crescimento dos ramos ortotrópicos e plagiotrópicos do cafeeiro sofrem variações sazonais durante todo o ano, sendo que sob temperaturas mínimas do ar abaixo de 17°C, a taxa de crescimento dos ramos é reduzida (FERREIRA et al., 2013).

O padrão de taxa de crescimento de ramos plagiotropicos e ortotrópicos avaliados neste estudo foi semelhante ao apresentado noutros trabalhos (Libardi et al., 1998; Partelli et al., 2010; 2013), observando-se decréscimo significativo de crescimento de ramos de plantas de *C. canephora* quando cultivado sob temperatura mínima do ar abaixo de 17°C. Corroborando com essas afirmações, Covre et al., (2016), estudando o crescimento vegetativo de plantas de café Conilon sob dois regimes hídricos, na região Atlântica da Bahia, Brasil, verificaram que as temperaturas mínimas médias registradas durante a experimentação foram sempre acima de 17°C, e concluíram que a taxa de crescimento de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos de *C. canephora* não foram afetados negativamente por este fator.

Plantas de *C. canephora* apresentam maiores taxas de crescimento vegetativo em períodos de dias longos, quentes associado ao alto índice pluviométrico, quando comparado as taxas de crescimento vegetativo observadas nos meses mais frios e de dias curtos (BARROS et al., 1997; LIBARDI et al., 1998; NAZARENO et al., 2003; SILVA et al., 2004; PARTELLI et al., 2010). Plantas de *C. canephora* toleram altas temperaturas (RAMALHO et al., 2014), porém são menos adaptadas a baixas temperaturas (DaMATTA & RAMALHO, 2006; PARTELLI et al., 2009; BATISTA-SANTOS et al., 2011; RAMALHO et al., 2014; SCOTTI-CAMPOS et al., 2014).

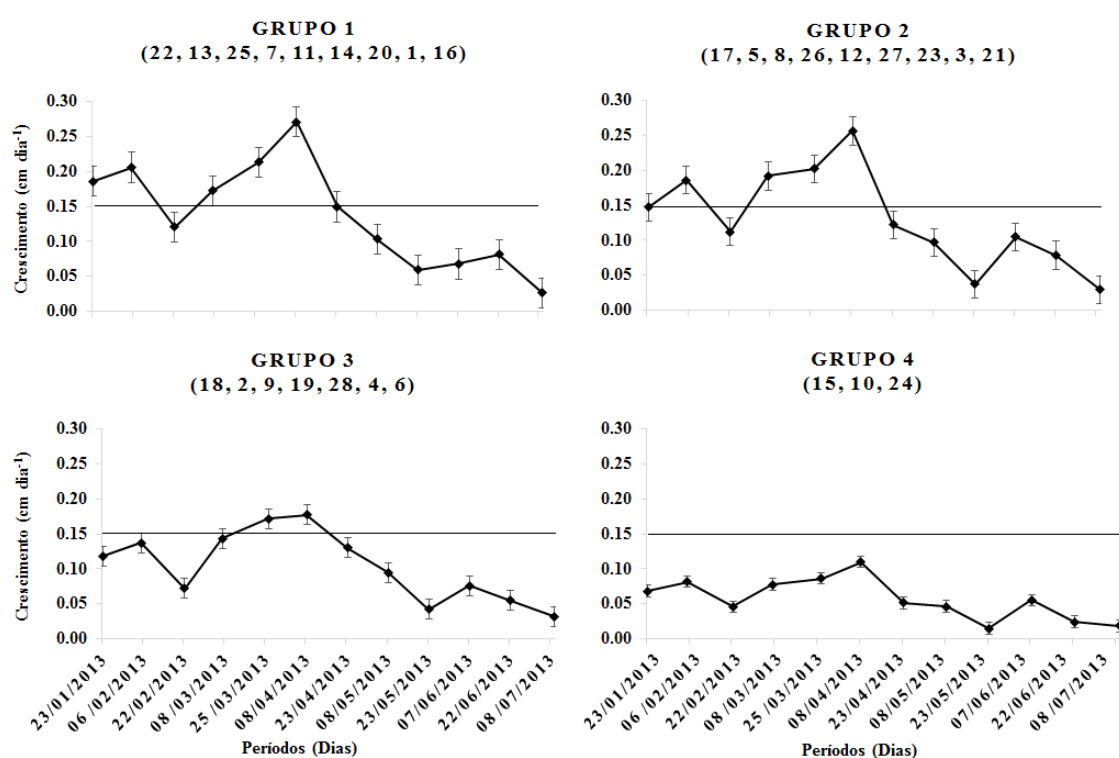


Figura 3 - Taxas diárias de crescimento vegetativo (cm dia⁻¹) dos ramos ortotrópicos, representadas em acordo com os grupos de acessos envolvendo genótipos de *Coffea canephora*, cultivados no sul do cerrado Goiano. Morrinhos - GO, 2013.

Observa-se na figura 3 que os quatro grupos de materiais genéticos obedecem diferentes regimes de alterações de crescimento em acordo com as mudanças climáticas sazonais ocorridas no período experimental. O grupo de genótipos 4 não sofre grandes flutuações nas taxas de crescimento durante o período de avaliação. Somente o grupo de genótipos 4 apresenta-se com taxas de crescimento sempre abaixo de 0,15 cm dia⁻¹, independente dos períodos avaliados.

O grupo 1 foi o menos prejudicado por esse período de estresse (temperaturas abaixo de 17°C), além disso o grupo 1 apresentou os maiores valores para taxa de crescimento de ramos ortotrópicos. Neste caso pode-se considerar que os genótipos pertencentes ao grupos 1 dos ramos ortotrópicos, como mais tolerantes ao estresse promovido principalmente pelas baixas temperaturas. Partelli et al., (2013), estudando o crescimento vegetativo sazonal de genótipos de *Coffea canephora*, em relação aos fatores climáticos, indentificaram um grupo de genótipos (V6, V7, V11, V12), que apesar de diminuíram a taxa de crescimento sob condição de temperatura mínima abaixo de 17°C, conseguiram manter um crescimento constante, e neste caso, relvenlando-se com potencial para tolerancia a baixas temperaturas positiva.

Na data de 23/05/2013 foi registrado a menor média para temperaturas mínimas (11,3°C) durante o período experimental, nesta data o grupo de genótipos de *C. canephora* que menos sofreu redução de taxa de crescimento de ramos ortotrópicos foi o grupo 4 (15, 10 e 24), esse comportamento pode ser explicado pelas pequenas variações ocorridas nas taxas de crescimento durante o experimento, o que coloca em evidência a baixa capacidade de responder de forma expressivas as alterações climáticas. Nesta data o grupo 1 (genótipos 22, 13, 25, 7, 11, 14, 20, 1, 16) foi o que apresentou o maior valor (0.06 cm dia⁻¹) de taxa de crescimento para ramos ortotrópicos, sendo quatro vezes maior quando comparada ao valor (0.015 cm dia⁻¹) alcançado pelo grupo 4 (Figura 3).

O estresse promovido pelo frio afeta drasticamente o aparato fotossintético do cafeeiro conilon, diminuindo a fotossíntese líquida (Pn) e parâmetros da fluorescência (BATISTA-SANTOS et al., 2011), provocando interferências na redução da taxa de crescimento. Esses prejuízos são motivados pela sobreprodução de moléculas altamente reativas (ROS), as quais normalmente são referidas como subprodutos de reações redox (KOVALCHUK, 2010). Essas moléculas podem ser formadas por excitação, neste caso gerando o oxigênio singleto (¹O₂), ou formadas por sucessivas adições de elétrons ao O₂, reduzindo-o ao radical aniônico superóxido (O₂⁻), radical hidroperoxila (HO₂) ou peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) (D'AUTRÉAUX & TOLEDANO, 2007; BHATTACHARJEE, 2010).

Conseqüentemente a tolerância ao estresse está de certa maneira relacionada a ativação de mecanismos antioxidativos (FORTUNATO et al., 2010). As plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos responsáveis por neutralizar as ROS. O sistema celular de defesa antioxidante envolve componentes enzimáticos e também componentes não enzimáticos. Tais antioxidantes podem atuar evitando a formação de radicais livres, sequestrando radicais livres ou promovendo sua degradação, evitando a ocorrência de danos às células das plantas (SERKEDJIEVA, 2011), e neste caso provendo diferentes graus de adaptabilidade das plantas ao estresse.

Na figura 4 pode-se notar que para os grupos de genótipos 1, 3 e 4 a taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos modificou-se seguindo as mudanças climáticas sazonais ocorridas anualmente. O cafeeiro conilon normalmente possui crescimento rápido entre os meses de setembro a abril, e nos meses de maio a agosto o crescimento é lento (PARTELLI et al., 2013).

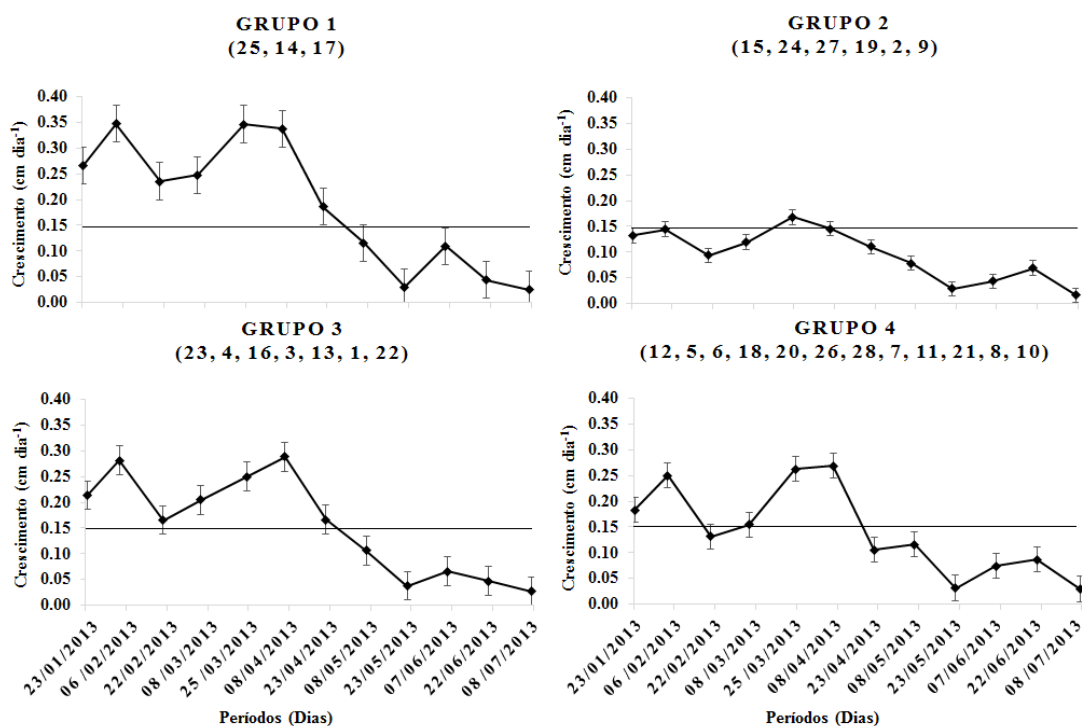


Figura 4 - Taxas diárias de crescimento vegetativo ($cm\ dia^{-1}$) dos ramos plagiotrópicos, representadas em acordo com os grupos de acessos envolvendo genótipos de *Coffea canephora*, cultivados no sul do cerrado Goiano. Morrinhos - GO, 2013.

Para taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos o grupo de genótipos 2 foi o mais prejudicado pelas baixas temperaturas registradas nos meses mais frios. O grupo 2 foi o que registrou o menor valor ($0,016 \text{ cm dia}^{-1}$) de taxa de crescimento de ramo plagiotrópico na data de avaliação 08/07/2013. O grupo de genótipos 1 foi o que apresentou os maiores valores de taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos na maioria das datas avaliadas nesta experimentação. A data de avaliação 23/05/2013, foi marcada pelo menor valor (12°C) de temperatura mínima média, e esse fato promoveu maior efeito prejudicial a taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos do grupo 2, obtendo o valor de $0,029 \text{ cm dia}^{-1}$, valor próximo ao apresentado pelos grupos 1 e 4, com $0,030$ e $0,031 \text{ cm dia}^{-1}$, respectivamente. Os maiores valores de taxa de crescimento observados para ramos plagiotrópicos foram de $0,348$ e $0,347 \text{ cm dia}^{-1}$ obtidos pelos genótipos do grupo 1 nas datas 06/02/2013 e 25/03/2013, respectivamente.

Observa-se que o grupo 1 foi o que apresentou maiores valores de taxa de crescimento tanto para ramos ortotrópicos, quanto para ramos plagiotrópicos. Apesar do grupo 1 ser apontado com melhores resultados independente do tipo de ramo, estes possuem genótipos distintos, sendo neste caso somente os genótipos 25 e 14 componentes do grupo 1 para ramos ortotrópicos e ramos plagiotrópicos. Os genótipos 25 e 14 (materiais genéticos denominados IVANM e LB), são os materiais genéticos que se destacaram quanto aos demais em termos de taxa de crescimento de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos. As menores taxas de crescimento foram identificadas respectivamente para os grupos 4 (genótipos 15, 10, 24) nos ramos ortotrópicos e no grupo 2 (genótipos 15, 24, 27, 19, 2, 9) para ramos plagiotrópicos. Nesta caso os genótipos 15 e 24 podem ser considerados os genótipos menos adaptados as condições experimentais de cultivo.

Em geral os resultados observados neste estudo estão em acordo com resultados publicados por Partelli et al. (2009), onde revelam que há redução severa da taxa de crescimento dos ramos de plantas do cafeeiro durante os meses com temperaturas baixas. Os 28 genótipos de *C. canephora* avaliados apresentaram crescimento diferenciado quando cultivados em 750 metros de altitude, estes resultados podem ser relacionados aos mecanismos de defesa e

aclimatação entre a diversidade de genótipos de *C. canephora* avaliados. Tendo em vista que esses genótipos de café podem apresentar mecanismos de adaptação ao estresse ocasionado pelo frio, tais como, perda da fluidez inerente à diminuição da insaturação lipídica e alterações quantitativas e qualitativas dos lipídios membranares propiciando a redução da susceptibilidade a lipoperoxidação preservando o metabolismo celular (SCOTTI-CAMPOS et al., 2003; 2014).

Obsevar-se que dentro da variabilidade de genótipos de *C. canephora* avaliadas neste estudo de cultivo a 750 metros de altitude, existem grupos de materiais genéticos que conseguiram em maior grau fazer uso dos mecanismos adaptativos, onde, o grupo 1 foi o que apresentou maiores valores melhor nas condições impostas tanto para característica taxa de crescimento de ramos ortotrópicos quanto para taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos, principalmente durante o período 23/01/2013 à 23/04/2013, prazo em que a temperatura mínima média se manteve acima dos 17°C.

Deve-se salientar que quanto maior o crescimento de ramos plagiotrópicos, o aumento de número de rosetas será proporcionalmente maior (COSTA et al., 2009), permitindo obter ganhos de produtividade (PARTELLI et al., 2013). Sendo assim, nota-se que os materiais genéticos de *C. canephora* 1V, 7V, 11V, 13V, LB, 18, N1, 3, 4, IVANM podem ser apontados com possível pontencial para o cultivo em altitude de 750 metros, baseado no crescimento vegetativo.

4. Conclusões

Os genótipos de *Coffea canephora* avaliados neste estudo apresentam dissimilaridade genética para as características taxa de crescimento de ramos ortotrópicos e taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos, com potencial para cultivo a 750 m de altitude.

De acordo com a taxa de crescimento, os 28 materiais genéticos de *Coffea canephora* foram separados em quatro grupos tanto para a característica taxa de

crescimento de ramos ortotrópicos quanto para a característica taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos.

Para taxa de crescimento de ramos plagiotropicos o grupo de genótipos 2 apresenta-se com pequenas variações durante o período de avaliação, quando comparado aos demais grupos de genótipos.

O grupo de genótipos 4 apresentou-se sempre com taxas de crescimento de ramos ortotrópicos inferiores a $0,15 \text{ cm dia}^{-1}$.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Espírito Santo pelo apoio a esta investigação, ao Intituto Federal Goiano de Morrinhos - GO pela disponibilização de recursos experimentais, ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural por disponibilizar as mudas de parte dos acessos de genótipos de *C. canephora* analisados neste estudo, e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo por disponibilizar recursos finaceiros. Ao CNPq por financiar a implantação da lavoura.

6. Referências

- ABREU, H.M.C.; NOBILE, P.M.; SHIMIZU, M.M.; YAMAMOTO, P.Y.; SILVA, E.A.; COLOMBO, C.A.; MAZZAFERA, P. Influence of air temperature on proteinase activity and beverage quality in *Coffea arabica*. *Braz. J. Bot.* 35, 357-376, 2012.
- ASSAD, E. D.; PINTO, H. S.; ZULLO JUNIOR, J.; ÁVILA, A. M. H. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 39(11), 1057-1064, 2004.
- BATISTA-SANTOS, P.; LIDON, F.C.; FORTUNATO, A.; LEITÃO, A.E.; LOPES, E.; PARTELLI, F.L.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. *J. Plant Physiol.*, 168(8), 792-806, 2011.
- BARBOSA, D.H.G.S.; RODRIGUES, W.P.; VIEIRA, H.D.; PARTELLI, F.L.; VIANA, A.P. Adaptability and stability of conilon coffee in areas of high altitud. *Gen. Mol. Res.*, 13(3), 7879-7888, 2014. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2014>
- BARROS, R.S.; MOTA, J.W.S.; DAMATTA, F.M.; MAESTRI, M. Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance. *Field Crop. Res.*, 54(1), 65-72, 1997.
- BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. 1-30.
- BRAGANÇA, S.M.; DECARVALHO, C.H.S.; DAFONSECA A.F.A.; FERRÃO, R. G. Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 36(5), 765-770, 2001.
- BUNN, C.; LADERACH, P.; RIVERA. O.O.; KIRSCHKE, D. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Clim. Change*, 129, 1-2, 89-101, 2015.
- CONAB. Café Brasil: primeiro levantamento de 2017: Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>>. Acesso em 22 de janeiro de 2017.
- COSTA, N.R.; DOMINGUES, M.C.S.; RODRIGUES, J.D.; TEIXEIRA FILHO, M.C.M. Desempenho do cafeeiro Icatu vermelho sob ação de biorregulador aplicado em fases reprodutivas da cultura. *Agrarian*, 2(5), 113-130, 2009.
- COVRE, A. M.; CANAL, L.; PARTELLI, F. L.; ALEXANDRE, R. S.; FERREIRA, A.; VIEIRA, H. D. Development of clonal seedlings of promising Conilon coffee (*Coffea canephora*) genotypes. *Aust. J. Crop Sci.*, 10, 385-392, 2016.
- COVRE, A.M.; PARTELLI, F.L.; BONOMO, R. BRAUN, H.; RONCHI, C.P. Vegetative growth of Conilon coffee plants under two water conditions in the Atlantic region of Bahia State, Brazil. *Acta Sci. Agron.*, 8(4), 535-545, 2016.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 1, 480, 2004.
- D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 813-824, 2007. doi: 10.1038/nrm2256.
- DaMATTA, F.M.; RAMALHO, J.D.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1), 55-81, 2006.
- DAVIS, A.P.; GOLE, T.W.; BAENA, S.; MOAT, J. The impact of climate change on indigenous arabica coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. *PLoS ONE*, 7(11), e47981, 2012.

- DALCOMO, J.M.; VIEIRA, H.D.; FERREIRA, A.; LIMA, W.L.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G.; PARTELLI, F.L. Evaluation of genetic divergence among clones of conilon coffee after scheduled cycle pruning. *Genet. Mol. Res.*, 14(4), 15417-15426, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.November.30.19>
- FERRAO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A. da; FERRÃO, R.G.; BARBOSA, W.M.; SOUZA, E.M.R. Genetic divergence in Conilon coffee revealed by RAPD markers. *Crop Breed. Applied Biotech.*, 9(1), 67-74, 2009.
- FERREIRA, E.P.DEB.; PARTELLI, F.L.; DIDONET, A.D.; MARRA, G.E.R.; BRAUN, H. Crescimento vegetativo de *Coffea arabica* L. influenciado por irrigação e fatores climáticos no Cerrado Goiano. *Ciênc. Agrár.*, 34(6), 3235-3244, 2013. DOI 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl1p3235
- FERREIRA, A.; CECON, P.R.; CRUZ, C.D.; FERRÃO, R.G.; SILVA, M.F.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G. Seleção simultânea de *Coffea canephora* por meio da combinação de análise de fatores e índices de seleção. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 40, 1189-1195, 2005.
- FONSECA, A.F.A. DA; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D.; SAKAIYAMA, N.S.; FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; BRAGANÇA, S.M. Genetic divergence in conilon coffee. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 41, 4, 599-605, 2006.
- FORTUNATO, A.S.; GOULAO L.F.; RODRIGUES A.D.; JACKSON P.; PARTELLI, F.L.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. Sistema Antioxidativo de *Coffea* spp. na capacidade de aclimatação a estresse simultâneo de frio e seca. VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 22 a 25 de Agosto de 2011, Araxá – MG.
- FORTUNATO, A.; LIDON, F.C.; BATISTA-SANTOS, P.; LEITÃO, A.E.; PAIS, I.P.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* spp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *J. Plant Physiol.*, 167, 333-42, 2010.
- FREITAS, R.G.; DE VASCONCELOS, E.S.; CRUZ, C.D.; ROSADO, A.M.; ROCHA, R.B.; TAKAMI, L.K. Prediction of genetic gains in open pollinated progenies of *Eucalyptus urograndis* cultivated in different environments and submitted to different selection procedures. *Rev. Árvore, Viçosa-MG*, 33, 2, 255-263, 2009
- ICO (International Coffee Organization). Trade statistics. Disponível em: <http://www.ico.org/prices/m1.htm>. Acesso em 13 de junho de 2016.
- IPCC. Intergovernmental panel on climate change. Working group III. Mitigation of Climate Change. 99.p. Disponível em: http://report.mitigation2014.org/drafts/final-draft-postplenary/ipcc_wg3_ar5_final-draft_postplenary_technical-summary.pdf. 2014. Acesso em 14 de junho de 2016.
- KOVALCHUK, I. Multiple roles of radicals in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.31-44.
- LIBARDI, V.C.M.; AMARAL, J.A.T.; AMARAL, J.F.T. Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro (*Coffea canephora* Pierre var. Conilon) no sul do Estado do Espírito Santo. *Rev. Bras. Agromet.*, 6(1), 23-28, 1998.
- MATIELLO, J.B.; GARCIA, A.W.R.; ALMEIDA, S.R.; FERNANDES, D.R. Cultura de café no Brasil: manual de recomendações. 3 ed. Rio de Janeiro: Bom Pastor, 2010. 542p.
- MILLIGAN, G.W.; COOPER, M.C. An examination of procedures for determining the number of cluster in data set. *Psychometrika Williamsburg*, 50, 159-179, 1985.

- MURO-ABAD, J.I.; ROCHA, R.B.; CRUZ, C.D. Obtenção de híbridos *Eucalyptus* spp. auxiliado por marcadores moleculares microssatélites. *Scientia Forestalis*, 67, 53-63, 2005.
- NAZARENO, R.B.; OLIVEIRA, C.A.S.; SANZONOWICZ, C.; SAMPAIO, J.B.R.; SILVA, J.C.P.; GUERRA, A.F. Crescimento inicial do cafeeiro rubi em respostas a doses de nitrogênio fósforo e potássio e a regime hídrico. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 38, (8), 903-910, 2003.
- NETO, J.M.M.; MOITA, G.C. Uma Introdução à Análise Exploratória de Dados Multivariados. *Química Nova*, 21(4), 1998.
- PARTELLI, F.L.; BATISTA-SANTOS, P.; SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.P.; QUARTIN, V.L.; VIEIRA, H.D.; RAMALHO, J.C. Characterization of the main lipid components of chloroplast membranes and cold induced changes in *Coffea* spp. *Environ. Exp. Bot.*, 74(1), 194-204, 2011.
- PARTELLI, F. L.; MARRÉ, W.B.; FALQUETO, A.R.; VIEIRA, H.D.; CAVATTE, P. C. Seasonal vegetative growth in genotypes of *Coffea canephora*, as related to climatic factors. *J. Agr. Sci.*, 5, 108-116, 2013.
- PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; SILVA, M.G.; RAMALHO, J.C. Seasonal vegetative growth of different age branches of Conilon coffee tree. *Semina: Cien. Agrar.*, 31(3), 619-626, 2010.
- PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; VIANA, A.P.; BATISTA-SANTOS, P.; RODRIGUES, A.P.D.; LEITÃO, A.E.; RAMALHO, J.C. Low temperature impact on photosynthetic parameters of coffee genotypes. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v. 44, (11), 1404-1415, 2009.
- RAMALHO, J.C.; DaMATTa, F.M.; RODRIGUES, A.P.; SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.; BATISTA-SANTOS, P.; PARTELLI, F.L.; RIBEIRO, A.; LIDON, F.C.; LEITÃO, A.E. Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theor. Exp. Plant Physiol.*, 26(1), 5-18, 2014.
- RENA, A.B.; BARROS, R.S.; MAESTRI, M.; SONDAHL, M.R. Coffee. In: SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P.C. (Ed.). *Handbook of environmental physiology of fruit crops. Subtropical and tropical crops*, v. II. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. p.101-122.
- ROCHA, R.; BARROS; VIEIRA, D.D.S.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L. Caracterização e uso da variabilidade genética de banco ativo de germoplasma de *Coffea canephora* pierre ex froehner. *Coffee Sci.*, 8(4), 478-485, 2013.
- RODRIGUES, W.N.; TOMAZ, M.A.; FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.DA. Diversity among genotypes of conilon coffee selected in espírito santo state. *Biosci. J.*, 31(6), 1643-1650, 2015.
- RODRIGUES, W.P.; MARTINS, M.Q.; FORTUNATO, A.S.; RODRIGUES, A.P.; SEMEDO, J.N.; SIMÕES-COSTA, M.C.; PAIS, I.P.; LEITÃO, A.E.; COLWELL, F.; GOULAO, L.; MÁGUAS, C.; MAIA, R.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Global Change Biol.*, 22(1), 415-431, 2016.
- SCOTTI-CAMPOS, P.; QUARTIN, V.; RAMALHO, J.C.; NUNES, M.A. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* spp. *Plants. Jornal Plant Physiology*, 160, 283-292, 2013.

- SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.P.; PARTELLI, F.L.; BATISTA-SANTOS, P.; RAMALHO, J.C. Phospholipids profile in chloroplasts of *Coffea* spp. genotypes differing in cold acclimation ability. *J. Plant Physiol.*, 171(3-4), 243-249, 2013.
- SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2011. Chap.13, 275-293.
- SILVA, E.A.; DAMATTA, F.M.; DUCATTI, C.; REGAZZI, A.J.; BARROS, R.S. Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis of Arabica coffee trees. *Field Crop. Res.*, 89(2-3), 349-357, 2004.
- SILVA, S.C.; SANTANA, N.M.P.; PELEGRINI, J.C. Caracterização Climática do Estado de Goiás. In: FILHO, A.R.; CHIARELOTO, R.D.; MAGALHÃES, L.F.; RODRIGUES, A.P.; MOREIRA, M.L.O. Série Geologia e Mineração. Goiânia: CDU 551.58 (817.3), n.3, p.133, 2006. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABb7cAL/caracterizacao-climatica-estado-goias> Acesso em: 14 de jan. de 2017.
- ZHU, S. Q.; ZHAO, H.; LIANG, J.S.; JI, B.H.; JIAO, D.M. relationships between phosphatidylglycerol molecular species of thylakoid membrane lipids and sensitivities to chilling-induced photoinhibition in rice. *J. Integrat. Plant Biol.*, 50, 194-202, 2008.

Capítulo 4

Nutrientes em folhas de genótipos de *Coffea canephora* cultivados a 750 metros de altitude

Resumo - As condições edafoclimáticas em que são submetidos o cultivo de genótipos de *Coffea canephora* podem induzir respostas diferenciadas em termos de concentração de nutrientes em folhas do cafeeiro coletas em diferentes épocas do ano. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da sazonalidade climática na concentração de nutrientes em folhas de diferentes genótipos de *C. canephora* cultivados a elevada altitude. O experimento foi realizado em Morrinhos, Estado de Goiás, Brasil, localizado a uma altitude de aproximadamente 750 metros. Para implantar a lavoura experimental foram selecionados 28 materiais genéticos de *C. canephora*. O espaçamento utilizado na lavoura experimental foi de 3,5 m x 1,0 m. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco plantas. Para experimentação amostras de folhas foram coletadas nos períodos de inverno e de verão, em lavoura experimental com seis anos de idade. As folhas coletadas foram analisadas quanto a composição mineral. Os dados obtidos foram analisados pelo teste t e teste de Tukey. Foram realizadas análises multivariadas por componentes principais, dissimilaridade e agrupamento. Os resultados obtidos revelam que existe concentração diferenciada para teor de nutrientes acumulados em folhas coletadas no inverno em comparação com o teor de nutrientes contidos em folhas coletadas no verão. Em geral observa-se tendência de maior concentração de macro e micronutrientes em folhas coletadas no inverno quando comparadas ao teor de nutrientes contidos em folhas coletadas no verão.

Abstract - The edaphoclimatic conditions under which *Coffea canephora* genotypes are cultivated can induce different responses in terms of nutrient accumulation in coffee leaves collected at different times of the year. The objective of this study was to evaluate the influence of climatic seasonality on the accumulation of nutrients in leaves of different genotypes of *C. canephora* cultivated at high altitude. The experiment was carried out in Morrinhos, State of Goiás, Brazil, located at an altitude of approximately 750 meters. In order to implant the experimental plantation, 28 genetic materials of *C. canephora* were selected. The spacing used in the experimental plot was 3.5m x 1m. The design was a randomized block design, with four replications, each replicate being composed of five plants. For experimentation, leaf samples were collected in the winter and summer periods, in an experimental field at six years of age. The collected leaves were analyzed for mineral composition. The obtained data were analyzed by t test and Tukey test. Multivariate analyzes were performed by main components, dissimilarity and clustering. The results obtained show that there is a differentiated concentration for nutrient content accumulated in leaves collected in the winter compared to the nutrient content contained in leaves collected in the summer. In general, there is a trend of greater accumulation of macro and micronutrients in leaves collected in winter when compared to the content of nutrients contained in leaves collected in the summer.

1. Introdução

Produção mundial de grãos de café ultrapassou a marca de 144,7 Milhões de sacas (60Kg), dessa produção 41,5% foi de café Conilon, onde o Brasil, é o segundo maior produtor mundial dessa espécie (International Coffee Organização Mundial da Saúde [ICO], 2016). Em geral o melhor desenvolvimento de *Coffea canephora* é observado em temperaturas médias anuais de 22°C a 26°C (DaMATTA & RAMALHO, 2006; MATIELLO et al., 2010), observando-se tolerância a temperaturas de até 37°C por meio da manutenção ou aumento da moléculas protetoras (MARTINS et al., 2016). Para *C. canephora* cv. Conilon o maior crescimento é observado quando a temperatura média mínima está acima de 17°C (PARTELLI et al., 2013; COVRE et al., 2016).

Em geral o cafeeiro quando submetido ao cultivo em temperatura inferior a 13°C, sofre várias alterações metabólicas, na composição e na estrutura dos complexos de pigmentos fotossintéticos e as classes lipídicas, prejudicando diversos componentes do processo fotossintético com intensidades diferenciadas entre os genótipos e espécies (CAMPOS et al., 2003; 2014; RAMALHO et al., 2003; SILVA et al., 2004, PRAXEDES et al., 2006; PARTELLI et al., 2009; 2011; 2013; BATISTA-SANTOS et al., 2011).

As alterações nos processos fotossintéticos do cafeeiro ocasionam redução da condutância estomática, que induz a redução da transpiração das plantas de café, e neste caso, podendo afetar negativamente a absorção de água e nutrientes. Nestas condições deve-se considerar que as plantas possuem características específicas de cada espécie, as quais são diferenciadas de acordo com as quantidades de nutrientes acumulados nos seus diferentes órgãos. Segundo Larcher (2000), a eficiência e prioridade de absorção de determinado nutriente pela raiz são características definidas geneticamente. Deve-se considerar ainda que, além da espécie e do genótipo, as quantidades de nutrientes acumuladas variam com o local, época do ano, idade, órgãos e tecidos da planta (KOZLOWSKI & PALLARDY (1996); PREZOTTI & BRAGANÇA, 2013).

Vários estudos indicam que existem diferenças na eficiência nutricional entre genótipos de *C. canephora* (BRAGANÇA et al., 2007; COVRE et al., 2016;

MARTINS et al., 2013, 2015a, 2015b; GOMES et al., 2016; NETO et al., 2016). Esse fato pode ser explicado pela ampla variabilidade intra e interespecífica entre genótipos de *C. canephora*, principalmente quando se avalia característica taxa de crescimento, tolerância à seca, ciclo de maturação, acúmulo de nutrientes e resistência ao estresse (WELCH, 1995; FONSECA et al., 2004; FERRÃO et al., 2008; MARRACCINI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; MARTINS et al., 2015a). O que possibilita a exploração dessa diversidade para identificação de material genético adaptado a diversas condições de solo e clima (MARTINS et al., 2015b).

Tendo em vista a falta de estudos sobre o comportamento de concentração de nutrientes em *C. canephora* cultivado no clima de altitude elevada, esse estudo objetivou avaliar o influências da sazonalidade climática no concentração de nutrientes em folhas de diferentes genótipos de *C. canephora* cultivados a 750 metros de altitude.

2. Materiais e métodos

O experimento foi realizado em Morrinhos, Estado de Goiás, Brasil, localizado a uma altitude de aproximadamente 750 metros. A região de Morrinhos, localizada no estado de Goiás é caracterizada por apresentar um déficit hídrico a partir do mês de abril até o mês de outubro, tem uma topografia plana e relevo ondulado, a temperatura média anual de 20 °C, sendo que a temperatura mínima do ar varia de 10°C (julho) a 20 °C (nos meses de inverno), e a média de temperatura anual mínima é 18°C. Na Figura 1 estão representados os dados climáticos referentes ao período de 04/04/2015 à 31/03/2016, correspondente a fase experimental. Para implantar a lavoura experimental foram selecionados 28 materiais genéticos de *C. canephora* (Tabela 1).

As mudas dos 28 genótipos de *Coffea canephora* utilizadas no plantio foram produzidas em viveiro certificado pelo MAPA, localizado no município de Marilândia - ES. A lavoura experimental foi implantada no mês de novembro de 2010. O genótipo 15 denominado 14 da EMCAPA 8121 (Bragança et al., 2001),

não foi avaliado neste experimento, tendo em vista que todas suas plantas morreram.

Tabela 1 - Lista dos 28 acessos dos genótipos de *C. canephora* utilizados nesta experimentação, Instituto Federal Goiano, Morrinhos - GO.

| A | CA | A | CA |
|-----|----|---|-------------|
| 1V | 1 | NV2 | 14 |
| 2V | 2 | 14 da EMCAPA 8121 (Bragança et al., 2001) | 15 |
| 3V | 3 | Clone 18 | 16 |
| 4V | 4 | NV1 | 17 |
| 5V | 5 | NV8 | 18 |
| 6V | 6 | P1 | 19 |
| 7V | 7 | 3 da EMCAPA 8121 (Bragança et al., 2001) | 20 |
| 8V | 8 | P2 | 21 |
| 9V | 9 | 4 da Bahia | 22 |
| 10V | 10 | NV3 | 23 |
| 11V | 11 | Verdim TA | 24 |
| 12V | 12 | A1 | 25 |
| 13V | 13 | SEMENTES ROBUSTÃO | 26, 27 e 28 |

(A): Acessos; (CA): Código dos acessos, correspondentes aos 28 genótipos de *C. canephora* analisados neste experimento.

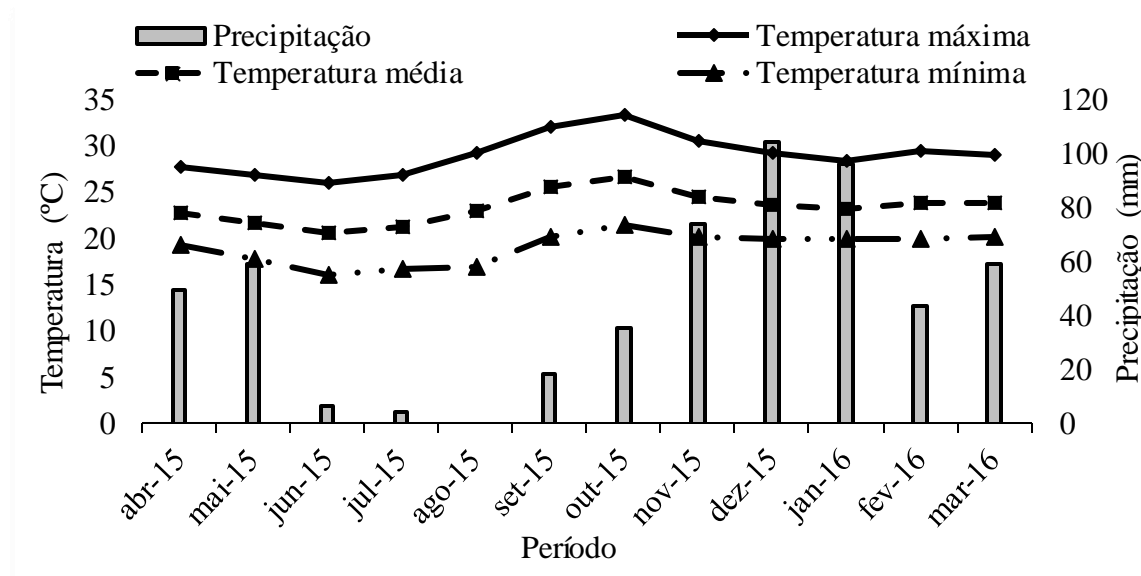


Figura 1 - Valores médios quinzenais referentes as temperaturas máximas (max), temperaturas mínimas (min), temperaturas médias (med) expressos em °C e precipitação média (prec) expresso em mm, durante o período de experimentação, Morrinhos - GO.

O espaçamento utilizado na lavoura experimental foi de 3,5m x 1m, correspondente a distância entre linha e entre plantas, respectivamente, e neste caso ocupando 3,5 m² por planta. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco plantas. Os tratos culturais correspondentes a adubação foram realizados conforme as orientações técnicas para a cultura do cafeeiro seguindo as recomendações conforme a produtividade esperada (PREZOTTI et al., 2007). Foram realizadas podas para controle de ramos execivos, mantendo o padrão de Ca. 12.000-15.000 hastes/ha (FONSECA et al., 2007; SILVEIRA et al., 1993; SILVEIRA et al., 2008). Foram realizadas capinas manuais (trilhar o local de adubação), uma capina mecanizada e uma capinas químicas, utilizando o ingrediente ativo Glyfosate, na dose de 1,0 L/hectare do produto comercial. Não foram aplicados micronutrientes, inseticidas ou fungicidas e nem utilizada irrigação, durante o ano do estudo. Para experimentação as amostras de folhas foram coletadas nos períodos de inverno (09/08/2015) e de verão (12/03/2016), na quarta safra dessa lavoura experimental. Foram coletados os 3° e 4° pares de folhas de ramos produtivos localizados no terço médio da planta. Após as folhas coletadas foram secas em estufa de circulação forçada, durante 48 horas, a 60-70°C. Em seguida as folhas foram moidas para análise da composição mineral pela metodologia proposta por Tedesco et al., (1995). Amostras de solo na camada 0-20 e 20-40, foram retiradas e analisadas quanto as características químicas, seguindo as recomendações da Embrapa, (2011; 2013) e características físicas seguindo Almeida et al., (2012) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Caracterização Química de solos coletados na área experimental deste estudo, Morrinhos - GO.

| Amostras | pH | P | K | Na | Ca | Mg | Al | H + Al | SB | t | T | V | m | MO |
|----------|------------------|------|--------------------|------|------|------|------|--------------------------------------|------|------|------|-------|------|-------------------|
| | H ₂ O | | mgdm ⁻³ | | | | | cmolc ⁻¹ dm ⁻³ | | | | % | % | gKg ⁻¹ |
| 0-20 | 5,45 | 1,43 | 92,00 | 5,00 | 2,44 | 0,39 | 0,05 | 5,28 | 5,09 | 3,14 | 8,37 | 36,92 | 1,59 | 32,23 |
| 20-40 | 5,41 | 0,61 | 51,00 | 3,00 | 1,74 | 0,34 | 0,05 | 4,78 | 2,22 | 2,27 | 7,00 | 31,69 | 2,20 | 30,23 |

Soma de bases trocáveis (SB), Matéria orgânica (MO), alumínio trocável (Al³⁺), fósforo disponível (P), potássio (K), cálcio (Ca²⁺), Sódio (Na) e magnésio (Mg²⁺) trocáveis, Capacidade de troca de cátions a pH7 (T) e efetiva (t), saturação por bases (V) e índice de saturação por Al (m).

Tabela 3 - Caracterização granulométrica e classificação textural de solos coletados na área experimental deste estudo, Morrinhos - Go.

| Amostras | Areia total | Silte | Argila | Classificação |
|----------|-------------|-------|--------|------------------------|
| | % | % | % | |
| 0-20 | 34 | 6 | 60 | Textura Argilosa |
| 20-40 | 33 | 6 | 61 | Textura Muito Argilosa |

Os dados sobre concentração de nutrientes em folhas dos 27 genótipos avaliados neste estudo foram analisados pelo método multivariado por agrupamento, gerando um dendrograma elaborado a partir da matriz de distância Euclidiana e agrupamento realizado pelo método de ligação completa (vizinho mais distante) (CRUZ & REGAZZI, 1997; BARROSO & ARTES, 2003; CRUZ & CARNEIRO, 2003; CRUZ, 2006; FERREIRA, 2008). Para formação dos grupos foi calculado um ponto de corte, utilizando a constante de 1,25 considerando o sugerido por Milligan & Cooper (1985), utilizando-se a fórmula: $(M+1,25*sd)$, onde: M= média dos valores dos pontos de junção; sd= errão padrão dos valores dos pontos de junção. Foi realizada análise multivariada por ordenação envolvendo análise de componetes principais. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância utilizando o Teste t, ao nível de 5% de probabilidade. Para comparação das concentrações médias dos nutrientes nas folhas dos cafeeiros, os valores obtidos para os ambientes (Inverno e Verão), foram analisados utilizando o teste de Tukey, adotando 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R Core Team.

3. Resultados e discussão

Observa-se no dendrograma que o ponto de corte para separação dos grupos de genótipos foi determinado no ponto 52, e neste caso sendo formados nove grupos de genótipos de *C. canéfora* (Figura 2). O primeiro, segundo, terceiro, quarto e oitavo grupos foram compostos de forma isolada, correspondendo aos genótipos 2, 14, 17, 18 e 15 respectivamente. O quinto grupo está composto pelos genótipos (1, 4, 6 e 13), para o sexto grupo foram agrupados os genótipos (24, 9, 5, 8, 27, 19, 26), para o sétimo grupo foram agrupados os genótipos (11, 16, 3, 7, 10, 20, 23) e por fim o grupo número nove foi composto quatro genótipos (12, 21, 22, 25). Nota-se que dos 27 acessos de *C. canéfora* analisados neste estudo

apresentam-se nove grupos de genótipos que são considerados semelhantes em termos de concentração de nutrientes. Esses resultados podem ser validados tendo em vista o estudo publicado por Rodrigues et al. (2015), em que, concluíram que o café conilon possui alta diversidade independente das características avaliadas.

Segundo Guedes et al. (2013), estudar a diversidade genética utilizando técnicas multivariadas é importante para o planejamento e definição de estratégias de trabalho em programas de melhoramento. Os resultados obtidos neste estudo podem ser considerados relevantes, tendo em vista que foi identificado alta diversidade em termos do comportamento de concentração de nutrientes. O emprego de indivíduos com diferentes padrões de dissimilaridade em programas de melhoramento genético é determinante para o sucesso, pois aumenta-se variabilidade genética proporcionando maiores ganhos na seleção (CRUZ et al., 2004). A variabilidade genética encontrada em *C. canephora* permitiu a seleção de genótipos superiores para diferentes características, tais como adaptação ampla, alto rendimento, altura da planta, resistência a doenças, pragas, estresse abiótico, qualidade, etc. (HENDRE & AGGARWAL, 2007), dessa maneira suprimindo as necessidades requeridas pelo cafeeiro e mantendo sobrevivência do mercado desta commodity.

Na tabela 4 observa-se o quadro de análise de variância, onde para a característica concentração dos nutrientes (N, Mg e Fe), não foi verificada interação significativa entre os fatores grupos de genótipos X ambientes, no entanto foi observado que existe diferença significativa para concentração desses nutrientes quando observa-se isoladamente o fator ambiente e o fator grupos de genótipos. O fato de ocorrer diferenças entre os grupos de genótipos é importante, tendo em vista que, esses resultados estão em concordância com os resultados obtidos na análise de divergência tal como pode ser averiguado na Figura 2. Ainda na tabela 4 pode-se observar que para o comportamento de concentração dos nutrientes (P, K, Ca, S, B, Cu, Mn, Zn), a análise de variância revela interação significativa entre os fatores grupos de genótipos X ambientes. Neste caso as diferenças no comportamento de concentração de nutrientes nos diferentes ambientes foram avaliadas para cada genótipo separadamente.

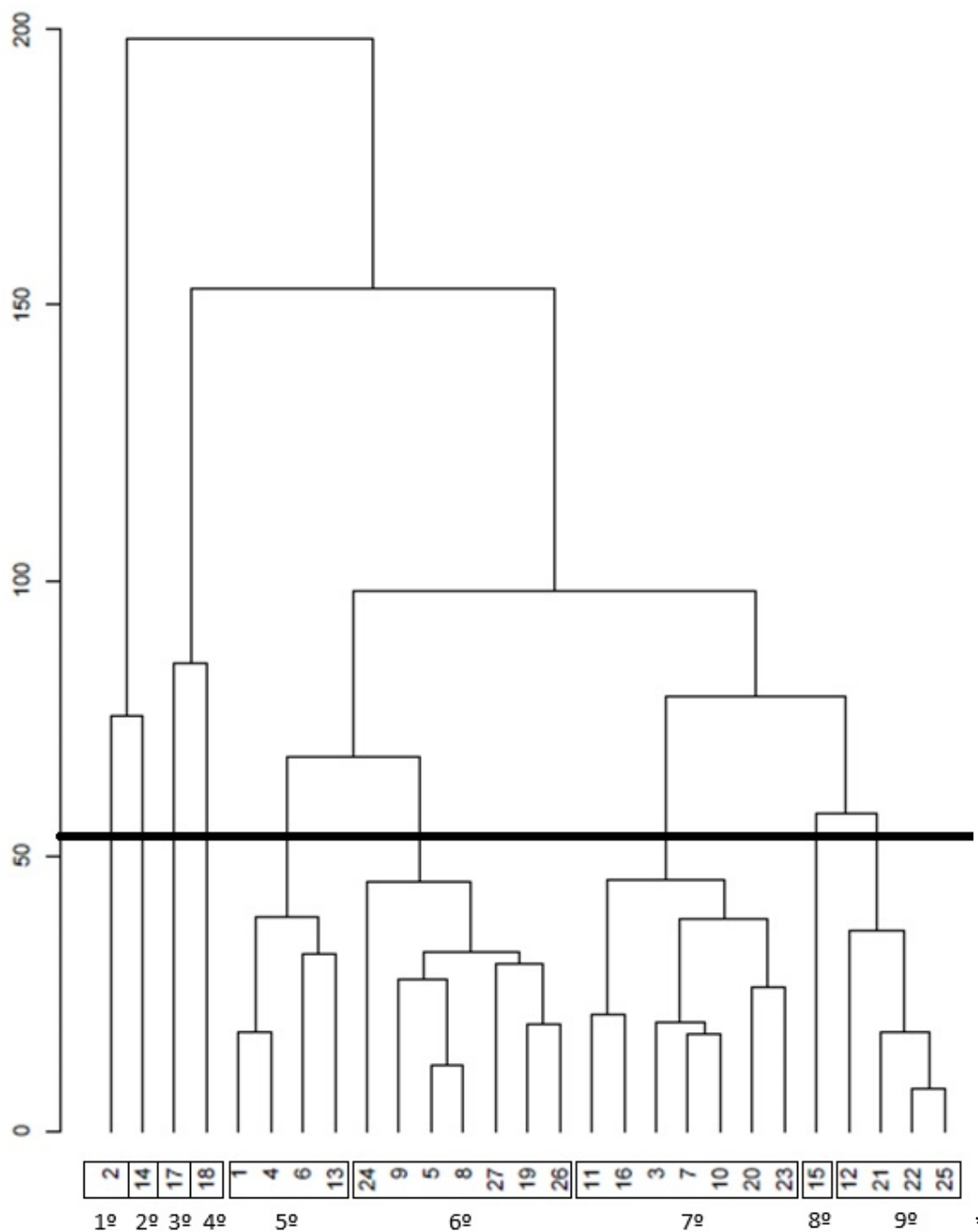


Figura 2 - Dendrogramas construídos utilizando ligação completa, a partir da matriz de dissimilaridade genética utilizando a distância Euclidiana utilizando a variável concentração média de macro e micro nutrientes em folhas de 27 genótipos de *C. canephora*, coletadas em duas épocas (inverno e verão), cultivados no sul do cerrado Goiano. Morrinhos - GO, 2016.

Tabela 4 - Análise de variância para a característica concentração de nutrientes em folhas coletadas em diferentes ambientes (inverno e verão), de diferentes genótipos de *C. canephora* cultivados em altitude elevada, Morrinhos - GO, 2016.

| FV | GL | Quadrado médio e significância | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|----|--------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|-------------|---|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| | | (g/Kg) | | | | | | | | | | (mg/Kg) | | | | | | | | | | | | | |
| | | N | P | K | Ca | Mg | S | B | Cu | Fe | Mn | Zn | | | | | | | | | | | | | |
| Bloco | 3 | 1,09 ^{ns} | 0,00139 ^{ns} | 3,890 ^{ns} | 1,559 ^{ns} | 0,07412 ^{ns} | 0,00235 ^{ns} | 96,8 ^{ns} | 17,178 ^{ns} | 1305,00 ^{ns} | 147,40 ^{ns} | 0,790 ^{ns} | Ambiente | 1 | 361,63 ^{**} | 0,49667 ^{**} | 16,255 ^{ns} | 147,090 ^{**} | 1,6805 ^{**} | 1,53125 ^{**} | 10287,3 ^{**} | 4,268 ^{ns} | 813822,00 ^{**} | 1558,10 ^{**} | 140,00 ^{**} |
| Grupo | 8 | 14,09 ^{**} | 0,11594 ^{**} | 90,226 ^{**} | 34,435 ^{**} | 1,1214 ^{**} | 0,18448 ^{**} | 3906,1 ^{**} | 24,554 ^{ns} | 24962,00 ^{**} | 11410,50 ^{**} | 3,09 [*] | Amb * Grupo | 8 | 2,59 ^{ns} | 0,06670 [*] | 25,215 ^{**} | 5,390 ^{**} | 0,1383 ^{ns} | 0,08666 ^{**} | 1665,4 ^{**} | 158,444 ^{**} | 6737,00 ^{ns} | 845,70 ^{**} | 3,08 [*] |
| Resíduo | 51 | 2,08 | 0,02793 | 8,157 | 1,852 | 0,07993 | 0,02747 | 84,5 | 21,750 | 4036,00 | 347,90 | 1,182 | CV(%) | | 7,28 | 14,06 | 11,82 | 9,45 | 15,11 | 8,48 | 14,02 | 15,02 | 27,10 | 17,44 | 13,93 |

^(ns) não significativo; ^(*) significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^(**) significativo ao nível de 1% de probabilidade, ambos utilizando o teste F.

Observa-se a comparação das concentrações médias dos nutrientes que possuem o mesmo comportamento de concentração de nutrientes nas folhas para todos os grupos de genótipos avaliados neste estudo. Com relação a concentração de nitrogênio (N) foi observado maior valor ($22,04 \text{ g Kg}^{-1}$) em folhas coletadas no período de inverno. Para o nutriente magnésio (Mg) o maior valor médio ($2,02 \text{ mg Kg}^{-1}$) foi observado em folhas coletadas no inverno. No que se refere a concentração do nutriente ferro nas folhas, o maior valor médio ($340,73 \text{ mg Kg}^{-1}$) foi apresentado em folhas coletadas no inverno (Tabela 5).

Em geral nota-se que para os nutrientes (N, Mg e Fe), a maior concentração ocorre em folhas Coletadas no inverno, quando comparado ao teor desses nutrientes em revelados para folhas coletadas no verão. N e Mg são elementos importantes relacionados com ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/Oxigenase (Rubisco), que é uma enzima-chave da fotossíntese (TAIZ et al., 2015).

Nas plantas, aproximadamente 80 % do Fe ocorre nos cloroplastos, onde têm um papel importante na fotossíntese e biossíntese de proteínas e clorofila. É componente de sistemas redox (mecanismo de defesa da planta), sendo constituinte enzimático das hemoproteínas (citocromos, catalases, peroxidases, legemoglobina), ferrosulfoproteínas (ferredoxina, izoenzimas superóxido dismutase, aconitase), além de outras enzimas menos caracterizadas, como as lipoxigenases e coproporfirinogênio oxidase (MARSCHNER, 1995; BUCHANAN, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2002). Segundo Bragança et al., (2007), o aumento significativo do teor de ferro (Fe) em plantas de café conilon possivelmente está associado a uma necessidade fisiológica. Nota-se neste estudo que houve maior concentração de nutrientes essenciais (N, Mg e Fe) ao normal funcionamento do sistema fotossintético em folhas coletadas no inverso.

O cafeeiro conilon quando submetido ao cultivo em temperatura inferior a 17°C , sofre alterações metabólicas, ocasionando prejuízos aos componentes do processo fotossintético com intensidades diferenciadas entre os genótipos (PARTELLI et al., 2013; COVRE et al., 2016). Considerando os resultados

obtidos neste estudo, relativo a maior concentração significativa de nutrientes (N, Mg e Fe) vitais ao funcionamento do sistema fotossintético em folhas coletadas no inverno, em comparação com folhas coletadas no verão, esses resultados podem ser explicados pelo fato de que possivelmente os genótipos de *C. canephora* avaliados nas condições climáticas deste estudo sofrem estresse causado por temperaturas baixas (abaixo de 17°C), as quais ocorreram durante o período de inverno, tal como registrado na figura 1.

Tabela 5 - Valores médios analisados pelas diferenças envolvendo somente o fator Ambiente, utilizando a característica teor de nutrientes, sendo os dados obtidos em experimento envolvendo cultivo de *C. canephora* em altitude elevada, localizado em Morrinhos - GO, 2016.

| Ambientes | Nutrientes | | |
|-----------|--------------------|--------|---------------------|
| | g Kg ⁻¹ | Mg | mg Kg ⁻¹ |
| | N | | Fe |
| Inverno | 22,04 a | 2,02 a | 340,73 a |
| Verão | 17,55 b | 1,71 b | 128,10 b |

⁽¹⁾ Nas colunas as médias com letras distintas diferem significativamente entre si, considerando o nível de $P < 0,05$, avaliado pelo teste de Tukey.

Observa-se a comparação em termos de concentração de nutrientes, entre os dois tipos de ambientes de coleta de folhas, para cada grupo de genótipos. Para concentração do nutriente fósforo (P), observa-se que somente para o grupo de genótipos 3 (17 ou NV8), houve diferença significativa entre os valores médios para teor de P em folhas coletadas nos diferentes ambientes (inverno e verão), sendo que o maior valor médio (1,30 g Kg⁻¹) foi observado em folhas coletadas no inverno (Tabela 6). No entanto, para os demais grupos de genótipos nota-se que apesar de não significativos, os valores para teor de P em folhas coletadas no verão são sempre menores quando comparado ao teor de P em folhas coletadas no inverno. O menor teor de P em folhas coletadas no verão pode ser atribuído ao fato de que as plantas de *C. canephora* estarem em fase pós-florada e enchimento de grãos. Prezotti & Bragança, (2013), observaram decréscimo no teor de Fósforo em folhas de café conilon Robusta Tropical, em função dos meses após a floração. Além do P, o comportamento de concentração de N e K em folhas de Robusta Tropical, também pode ser associada à mobilização de nutrientes para a formação dos frutos faz, e neste

caso promovendo a diminuição dos teores foliares de nutrientes considerados móveis no floema, como o N e o K (PREZOTTI & BRAGANÇA, (2013).

Observa-se que além do nutriente P, os nutrientes enxofre (S) e o cálcio (Ca), Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Zinco (Zn) também apresentaram tendência de maior concentração em folhas coletadas no inverno, esse comportamento foi observado para a maioria dos grupos de genótipos avaliados neste estudo (Tabela 6). O P é essencial para integridade da membranas lipídicas e síntese de ATP (MARSCHNER, 1995), enquanto S desempenha papéis chaves na atividade enzimática durante o transporte de elétrons e ainda na incorporação do açúcar no ciclo de Calvin em cloroplastos (TAIZ et al., 2015).

Em alguns casos determinados grupos de genótipos apresentação maior média significativa para concentração de determinado nutriente em folhas coletadas no verão, principalmente para o nutriente B, tal como observado para os grupos de genótipos 2, 3, 4, 6, 7 e 9, correspondendo a maior parte dos genótipos analisados neste estudo.

O Boro participa do crescimento celular, da biossíntese de componentes da parede celular, do metabolismo de fenóis, dos ácidos nucléicos, dos carboidratos e do AIA, além de conferir estabilidade e estrutura à parede celular (MARSCHNER, 1995; BUCHANAN, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2002). A o maior valor significativo para teor de Boro em folhas coletadas em verão quando comparado a folhas coletadas no inverno pode estar atribuído ao fato do cafeeiro estar em fase de maior taxa de crescimento e neste caso aumentando a demanda desse nutriente na folha para garantir as necessidades do cafeeiro tanto em termos de taxa de crescimento quanto em questão de atendimento as necessidades de aumento de demanda de energia no período após a florada. Além disso, deve levar em consideração que vários estudos têm mostrado que diferentes genótipos (WADT et al., 1999) apresentam diferenças nas concentrações de nutrientes em condições adversas de cultivo (PARTELLI et al., 2006), em diferentes regiões (DARA et al., 1992, WADT & DIAS, 2012) e estádios fenológicos (GOMES et al., 2016).

Tabela 6 - Valores médios analisados pelas diferenças dentro da interação Ambiente X Grupo, considerando a característica teor de nutrientes com dados obtidos em experimento envolvendo cultivo de *C. canephora* em altitude elevada, localizado em Morrinhos - GO, 2016.

| Grupos | Ambientes | Nutrientes | | | | | | | |
|--------|-----------|-----------------------|---------|---------|--------|------------------------|---------|----------|---------|
| | | (g Kg ⁻¹) | | | | (mg Kg ⁻¹) | | | |
| | | P | K | Ca | S | B | Cu | Mn | Zn |
| 1 | 1 | 1,20 a | 23,26 a | 14,13 a | 1,93 a | 45,18 a | 34,73 a | 123,56 a | 9,20 a |
| | 2 | 1,01 a | 17,96 b | 12,82 a | 1,49 b | 49,81 a | 23,77 b | 110,83 a | 5,15 b |
| 2 | 1 | 1,25 a | 18,65 a | 20,05 a | 2,15 a | 69,57 b | 27,75 a | 139,00 a | 9,90 a |
| | 2 | 1,00 a | 18,62 a | 15,53 b | 1,95 a | 99,82 a | 34,30 a | 95,05 b | 6,80 b |
| 3 | 1 | 1,30 a | 19,32 b | 18,00 a | 1,97 a | 69,02 b | 21,82 b | 182,28 a | 9,82 a |
| | 2 | 0,73 b | 25,23 a | 16,08 a | 2,00 a | 162,51 a | 42,73 a | 160,66 a | 7,80 b |
| 4 | 1 | 1,17 a | 27,30 b | 15,48 a | 2,35 a | 53,40 b | 32,12 a | 137,50 b | 10,20 a |
| | 2 | 1,20 a | 31,53 a | 14,48 a | 1,90 b | 70,58 a | 33,03 a | 165,33 a | 6,63 b |
| 5 | 1 | 1,19 a | 25,61 a | 13,39 a | 1,91 a | 43,60 a | 32,12 a | 76,49 a | 9,35 a |
| | 2 | 1,12 a | 24,67 a | 10,08 b | 1,55 b | 45,81 a | 27,43 a | 61,71 a | 5,56 b |
| 6 | 1 | 1,18 a | 23,16 a | 14,51 a | 1,90 a | 46,99 b | 27,68 a | 91,83 a | 7,72 a |
| | 2 | 1,18 a | 26,60 a | 12,98 a | 1,80 a | 69,23 a | 28,05 a | 92,15 a | 6,84 a |
| 7 | 1 | 1,28 a | 23,58 a | 17,17 a | 2,18 a | 49,62 b | 32,32 a | 109,50 a | 9,66 a |
| | 2 | 1,05 a | 23,76 a | 13,87 b | 1,81 b | 81,73 a | 32,10 a | 114,43 a | 6,58 b |
| 8 | 1 | 1,52 a | 29,02 a | 15,65 a | 2,37 a | 58,82 a | 35,30 a | 73,75 a | 9,05 a |
| | 2 | 1,32 a | 26,87 a | 9,65 b | 1,75 b | 54,92 a | 27,97 b | 49,60 a | 5,32 b |
| 9 | 1 | 1,33 a | 23,24 a | 14,10 a | 2,12 a | 46,41 b | 33,37 a | 70,25 a | 7,83 a |
| | 2 | 1,31 a | 27,04 a | 11,27 b | 2,01 a | 63,36 a | 33,21 a | 70,66 a | 6,98 a |

(¹) Nas colunas as médias com letras distintas diferem significativamente entre si, considerando o nível de $P < 0,05$, avaliado pelo teste de Tukey.

Na análise de componentes principais para folhas coletadas no inverno, nota-se que o macronutriente que descreve com mais intensidade o comportamento de concentração de nutrientes no grupo 2 foi o nutriente Ca (Figura 3A). Para o grupo de genótipos 7 o macronutrientes que melhor descreve o comportamento desse grupo foi o Mg. Os nutrientes N, P e S descrevem com maior intensidade o grupo 8, sendo que o P representa-se com maior influência nas resposta de concentração de nutrientes para o grupo 8 quando comparado aos nutrientes N e S. O nutriente K explica em maior grau o comportamento dos grupos de genótipos 9 e 4. Para os grupos de genótipos 1, 5, 6 e 3, nota-se não houve algum macronutriente estudado neste trabalho que explique com grande intensidade os seus comportamentos de concentração de nutrientes (Figura 3).

Na figura 3B, com relação aos descritores micronutrientes, nota-se que o micronutriente Fe explica com grande intensidade o grupo de genótipos 1 e 2. Em comparação com o Fe, o micronutriente Zn descreve em maior grau o grupo

de genótipos 2. O comportamento de concentração de nutriente dos grupos de genótipos 7 e 8, são fortemente explicados pelo micronutriente Cu, sendo que este nutriente explica em maior grau o comportamento para concentração de nutrientes do grupo 7 quando comparado ao grupo 8. Com relação aos grupos de genótipos 9, 5, 4, 3 e 6, não apresentaram nenhum micronutriente que descreva os seus comportamentos para concentração de nutrientes, com grande força.

Nota-se o estudo dos descritores em folhas coletadas no verão, onde para os macronutrientes foi verificado o nutriente N explica de maneira intensa o comportamento de concentração de nutrientes do grupo de genótipos 5 (Figura 4A). O macronutriente Mg descreve em maior grau o grupo de genótipo 7, tal como observado para a análise anterior envolvendo o estudo de descrição dos nutrientes em função dos grupos de genótipos observados nas figuras 3A e 4A. Observa-se que o nutriente Ca descreve em diferentes graus os grupos de genótipos 2 e 3, sendo que foi observado maior intensidade de descrição para o grupo 3 em comparação com o grupo 2 (Figura 4). Resultado esse que pode ser considerado adverso ao obtido na análise de componentes principais representado na figura 3A.

Verifica-se que o macronutriente enxofre (S) explica em certo grau os grupos de genótipos 3 e 4, sendo para o grupo 4 nota-se maior intensidade de descrição quando comparado ao grupo 3 (Figura 4). O nutriente P explica com grande intensidade o comportamento de teor de nutrientes em folhas coletadas no verão para os grupos de genótipos 6 e 8, no entanto o P descreve em maior grau o grupo 6, quando comparado ao grupo 8. O comportamento de concentração de macronutriente do grupo de genótipos 9 foi explicado em grande escala pelo nutriente K. Somente o grupo de genótipos 1 não foi descrito com grande força, por nenhum dos macronutrientes avaliados em folhas coletadas no verão (Figura 4).

Com relação a figura 4B, nota-se que para o grupo de genótipos 3 os micronutrientes que descrevem em alto grau o comportamento do seu teor em folhas coletadas no verão, são os Zn, B, Mn e Cu. Dentre esses micronutrientes

o que se destaca por descrever em maior grau o grupo 3 é o Zn. O micronutriente Mn explica com pequena força o comportamento de concentração de micronutriente do grupo 4. Os grupos 7 e 2, são descritos pelo micronutriente Fe, sendo maior intensidade de descrição observado para o grupo 7 quando comparado ao grupo 2. Os grupos de genótipos 1, 5, 6, 8 e 9 não foram explicados com grande intensidade por nenhum dos micronutrientes avaliados em folhas coletadas no verão (Figura 4B).

Em geral nota-se nas figuras 3 e 4, que existe padrão padrões de concentração de nutrientes diferenciados quando observa-se a interação entre os descritores (macro e micronutrientes) e objetos (grupos de genótipos), numa comparação entre os tipos de ambientes (inverno e verão) de coleta de folhas dos cafeeiros. O padrão de resposta que descreve com maior distribuição (em termos de nutrientes) os resultados para análise de componentes principais deste estudo, foram apresentados pelos macronutrientes em folhas coletadas no verão (Figura 4A). Esse comportamento pode ser explicado pelas condições climáticas favoráveis, as quais foram cultivadas as folhas coletadas no verão.

Neste caso nota-se que os resultados deste estudo indicam que os grupos de genótipos de *C. canephora* sofreram alteração significativas no teor de nutrientes apresentados pelas folhas dos cafeeiros coletadas no inverno e no verão. Essa diferença indicam que existem fatores promotores de estresse, tal como pode ser o caso deste estudo envolvendo o comportamento de concentração de nutrientes em ambiente de inverno e verão utilizando folhas de cafeeiros *C. canephora* cultivados em altitude elevada.

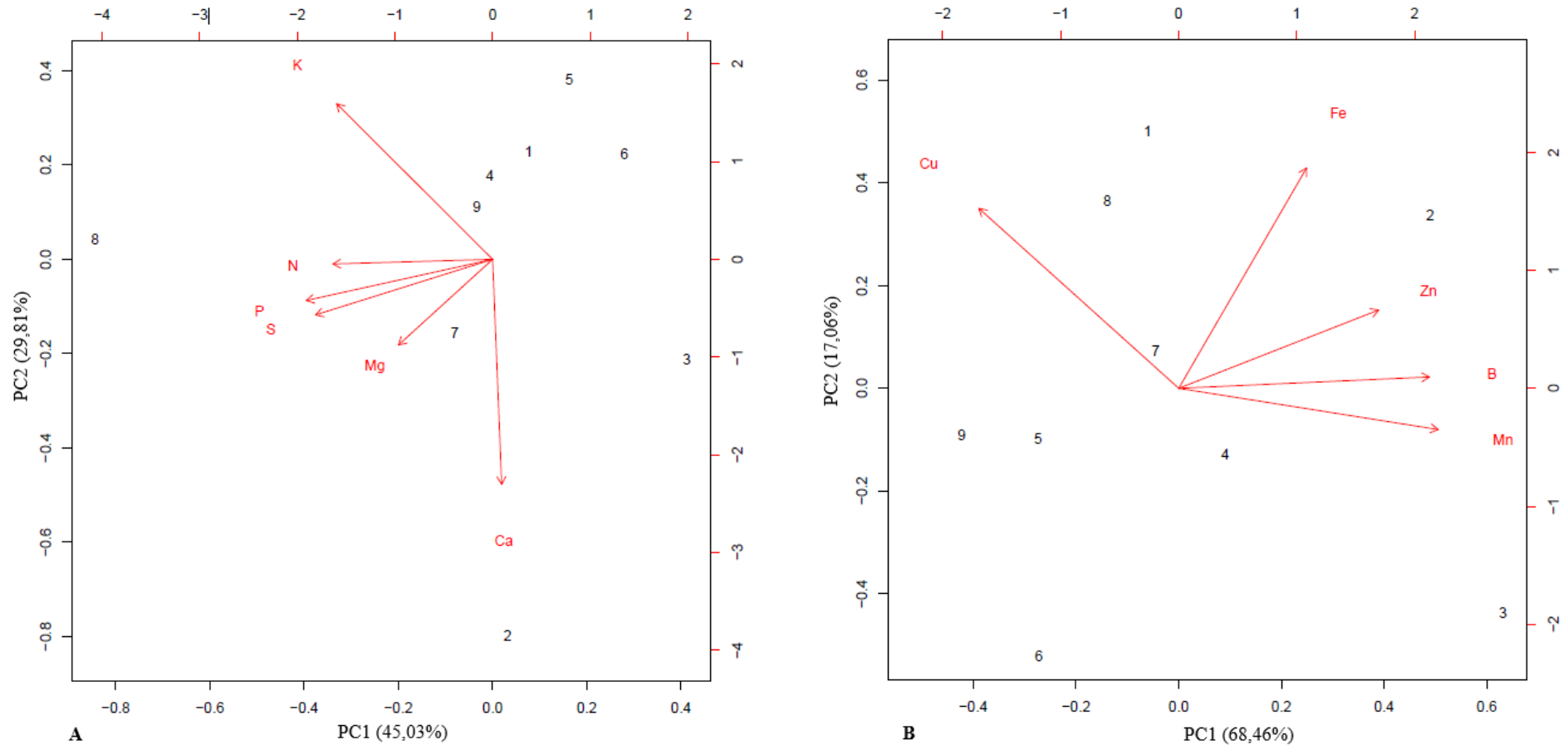


Figura 3 - Gráfico de escores da PC1 x PC2 referente a concentração de macronutrientes (A) e micronutrientes (B) em folhas de cafeeiros coletadas no inverno, representantes de nove grupos de genótipos de *C. canephora*, cultivados sob altitude elevada em Morrinhos - GO, 2016.

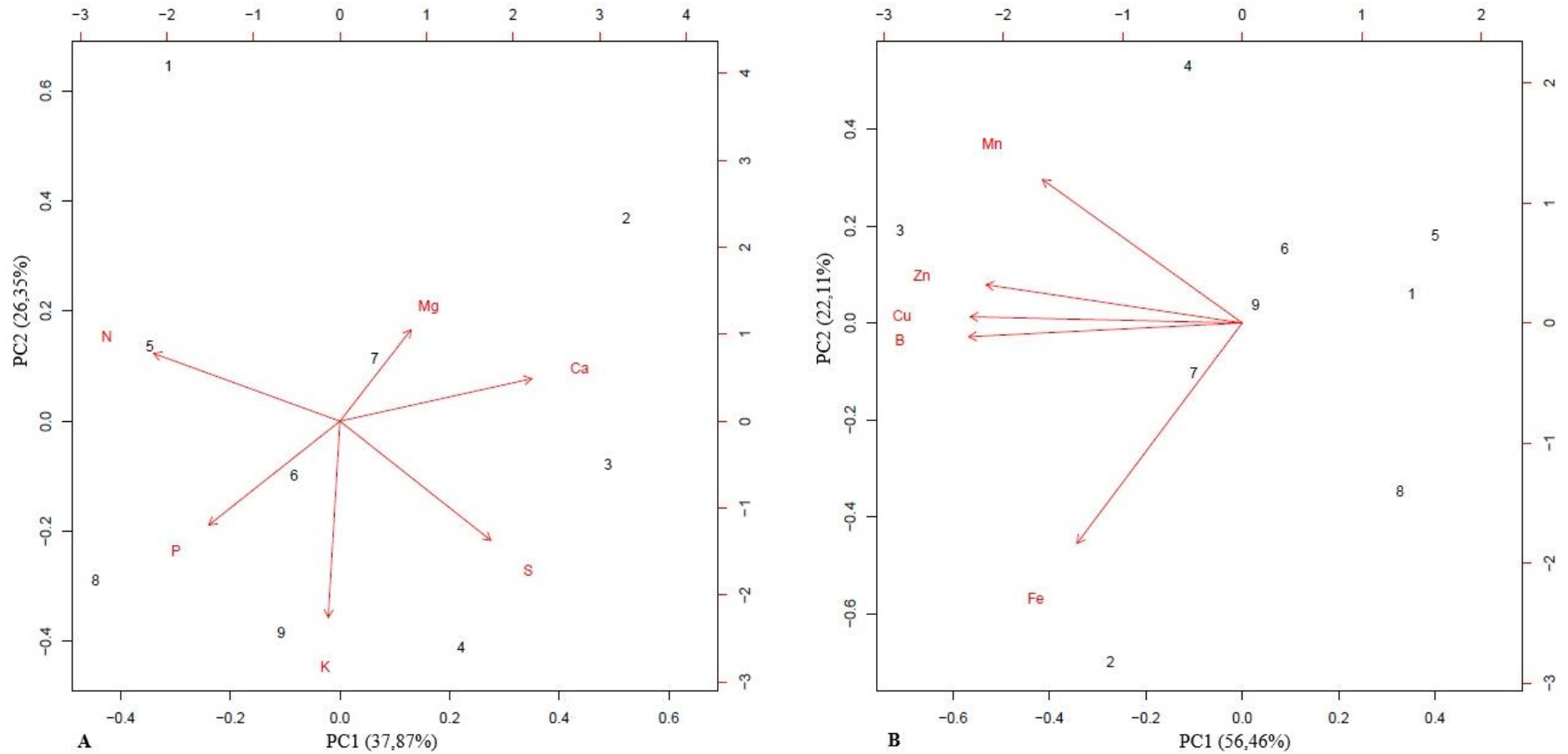


Figura 4 - Gráfico de escores da PC1 x PC2 referente a concentração de macronutrientes (A) e micronutrientes (B) em folhas de cafeeiros coletadas no verão, representantes de nove grupos de genótipos de *C. canephora*, cultivados sob altitude elevada em Morrinhos - GO, 2016.

4. Conclusões

Houve diferença no teor de macronutrientes nas folhas de café coletadas no inverno, quando comparadas as folhas coletadas no verão.

Os nutrientes N, Mg e Fe, considerados vitais ao funcionamento do sistema fotossintético, apresentam-se em maior teor nas folhas coletadas no inverno quando comparado as folhas coletadas no verão.

Para maioria dos nutrientes avaliados neste estudo foi observado maior teor em folhas coletadas no inverno, esse fato pode estar atrelado principalmente ao estresse ocorrido nos períodos com temperatura abaixo de 17°C.

Existem interações diferenciadas entre teor de nutrientes das folhas coletadas no inverno e verão, onde a análise de componentes principais especializou os nutrientes que explicam em maior ou menor grau o teor de nutrientes contidos em folhas do cafeeiro coletadas na estação de inverno e de verão.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Espírito Santo pelo apoio a esta investigação, ao Instituto Federal Goiano de Morrinhos - GO pela disponibilização de recursos experimentais, ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural por disponibilizar as mudas de parte dos acessos de genótipos de *C. canephora* analisados neste estudo, e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo por disponibilizar recursos financeiros. Ao CNPq por financiar a implantação da lavoura.

6. Referências

- BRAGANÇA, S.M.; MARTINEZ, H.E.P.; LEITE, H.G.; SANTOS, L.P.; SEDIYAMA, C.S.; ALVAREZ, V.H.; LANI, J.A. Concentração de b, cu, fe, mn e zn pelo cafeeiro conilon. *Revista Ceres*, v.54, n.314, p.398-404, 2007.
- BATISTA-SANTOS, P.; LIDON, F.C.; FORTUNATO, A.; LEITÃO, A.E.; LOPES, E.; PARTELLI, F.L.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C. The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. Photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. *Journal of Plant Physiology*, v.168, n.8, p.792-806, 2011.
- BARROSO, L.P.; ARTES, R. Análise multivariada. Lavras: UFLA, 2003. 151p.
- BUCHANAN BB, GRUISSSEN W & JONES RL. (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants*, 1nd ed. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists. 1367 p.
- CAMPOS, P.S.; PAIS, I.P.; PARTELLI, F.L.; BATISTA-SANTOS, P.; RAMALHO, J.C. Phospholipids profile in chloroplasts of *Coffea* spp. genotypes differing in cold acclimation ability. *Journal of Plant Physiology*, v.171, n.3-4, p.243-249, 2014.
- CAMPOS, P.S.; QUARTIN, V.; RAMALHO, J.C.; NUNES, M.A. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* spp. *Plants. Journal of Plant Physiology*, v.160, n.3, p.283-292, 2003.
- COVRE, A.M.; PARTELLI, F.L.; BONOMO, R.; BRAUN, H.; RONCHI, C.P. Crescimento vegetativo de plantas de café Conilon sob dois regimes hídricos, na região Atlântica da Bahia, Brasil. 2016, vol.38, n.4, pp.535-545.
- CONAB. Café Brasil: segundo levantamento de safra maio/2016: Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>>. Acesso em 02 de novembro de 2016.
- CRUZ, C.D. Programa genes: análise multivariada e simulação. Viçosa: UFV, 2006. 175p.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2003. 585p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2004, v.1. 480 p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2.ed. Viçosa: UFV, 1997. 390p.
- DaMATTA, F.M.; RAMALHO, J.D.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review. *Brazilian Journal Plant Physiology*, v.18, n.1, p.55-81, 2006.
- DARA, S.T.; FIXEN, P.E.; GELDERMAN, R.H. Sufficiency level and Diagnosis and Recommendation Integrated System approaches for evaluating the nitrogen status of the corn. *Agronomy Journal*, v.84, p.1006-1010, 1992.
- Embrapa Solos (2011) 'Manual de métodos de análise de solos.' 2nd edn (Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro).
- Embrapa Solos (2013) 'Sistema brasileiro de classificação de solos.' 3th edn (Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro).
- FERRÃO, R.G.; CRUZ, C.D.; FERREIRA, A.; CECON, P.R.; FERRÃO, M.A.G.F.; FONSECA, A.F.A.; CARNEIRO, P.C.S.; SILVA, M.F. Genetic parameters in conilon coffee. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, n.43, p.61-69, 2008.
- FERREIRA, D.F. Estatística multivariada. Lavras: UFLA, 2008. 662p.
- FONSECA, A.F.A.de.; FERRÃO, R.G.; LANI, J.A.; FERRÃO, M.A.G.; VOLPI, P. S.; VERDIN FILHO, A.C.; RONCHI, C.P.; GUARÇONI, M.A. Manejo da cultura

- do café conilon: espaçamento, densidade de plantio e podas. In: FERRÃO et al. (Eds.). *Café conilon*. Vitória, ES: Incaper, 2007. p.257-277, Cap. 9.
- FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; VERDIN FILHO, A.C.; VOLPI, O.S.; ZUCATELI, F. „Conilon Vitória-Incaper 8142”: improved *Coffea canephora* var. kouillou clone cultivar for the state of Espírito Santo. *Crop Breeding and applied Biotechnology*, n.4, p.503-505, 2004.
- GOMES, W.R.; RODRIGUES, W.P.; VIEIRA, H.D.; OLIVEIRA, M.G.; DIAS, J.R.M.; PARTELLI, F.L. Genetic diversity of standard leaf nutrients in *Coffea canephora* genotypes during phenological phases. *Genetics and Molecular Research*, v.15, n.4, p.1-13, 2016.
- GUEDES, J. M.; VILELA, D.J.M.; REZENDE, J.C.; SILVA, F.L.; BOTELHO, C.E.; CARVALHO, S.P. Divergência genética entre cafeeiros do germoplasma Maragogipe. *Bragantia*, v.72, n.2, p.127-132, 2013.
- HENDRE, P.S.; AGGARWAL, R.K. DNA markers: Development and application for genetic improvement of coffee. In: Varshney RK; Tuberosa R, editors. *Genomics-Assisted Crop Improvement - Genomics Applications in Crops*, v.2, p.399-434. 2007.
- International Coffee Organization [ICO] Total production by all exporting countries. Disponível em: www.ico.org/prices/po-production.pdf. Acessado em 11 de dezembro de 2016.
- KOZLOWSKI, T.T. & PALLARDY S.G. *Physiology of woody plants*, 2nd ed. San Diego, Academic Press, 1996. 411p.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Paulo: Rima Artes e Textos, 2000. 531 p.
- MARRACCINI, P.; VINECKY, F.; ALVES, G.S.C.; RAMOS, H.J.O.; ELBELT, S.; VIEIRA, N.G.; CARNEIRO, F.A.; SUJII, P.S.; ALEKCEVETCH, J.C.; SILVA, V.A.; DAMATTA, F.M.; FERRÃO, M.A.G.; LEROY, T.; POT, D.; VIEIRA, L.G.E., SILVA, F.R.; ANDRADE, A.C. Differentially expressed genes and protein sup on drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *Journal of Experimental Botany*, n.63, p.4191-4212, 2012.
- MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants* 2nd ed. London, Academic Press, 1995. 889p.
- MARTINS, L.D.; MACHADO, L.; TOMAZ, M.A.; AMARAL, J.F.T. The nutritional efficiency of *Coffea* spp. *African Journal of Biotechnology*, n.14, p.728-734, 2015a.
- MARTINS, L.D.; RODRIGUES, W.N.; MACHADO, L.; BRINATE, S.V.B.; COLODETTI, T.V.; AMARAL, J.F.; TOMAZ, M.A. Evidence of genetic tolerance to low availability of phosphorus in the soil among genotypes of *Coffea canephora*. *Genetics and Molecular Research*, n.14, p10576-10587, 201b.
- MARTINS, L.D.; TOMAZ, M.A.; AMARAL, J.F.T.; BRAGANCA, S.M.; MARTINEZ, H.E.P. Efficiency and response of conilon coffee clones to phosphorus fertilization. *Revista Ceres*. n.60, p.406-411, 2013.
- MATIELLO, J.B.; GARCIA, A.W.R.; ALMEIDA, S.R.; FERNANDES, D.R. *Cultura de café no Brasil: manual de recomendações*. 3 ed. Rio de Janeiro: Bom Pastor, 2010. 542p.
- MILLIGAN, G.W.; COOPER, M.C. An examination of procedures for determining the number of cluster in data set. *Psychometrika Williamsburg*, v.50, p.159-179, 1985.
- NETO, A.P.; FAVARIN, J.L.; HAMMOND, J.P.; TEZOTTO, T.; COUTO, H.T.Z. Analysis of Phosphorus Use Efficiency Traits in *Coffea* Genotypes Reveals

Coffea arabica and *Coffea canephora* Have Contrasting Phosphorus Uptake and Utilization Efficiencies. *Frontiers in Plant Science*. v.7, n.408, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.00408

PARTELLI, F.L.; BATISTA-SANTOS, P.; SCOTTI-CAMPOS, P.; PAIS, I.P.; QUARTIN, V. L.; VIEIRA, H. D.; RAMALHO, J.C. Characterization of the main lipid components of chloroplast membranes and cold induced changes in *Coffea* spp. *Environmental and Experimental Botany*, v.74, n.1, p.194-204, 2011.

PARTELLI, F.L.; MARRÉ, W.B.; FALQUETO, A.R.; VIEIRA, H.D.; CAVATTE, P. C. Seasonal vegetative growth in genotypes of *Coffea canephora*, as related to climatic factors. *Journal of Agricultural Science*, v.5, p.108-116, 2013.

PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; MONNERAT, P.H.; VIANA, A.P. Estabelecimento de normas Dris em cafeeiro conilon orgânico ou convencional no estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, n.30, p.443-451, 2006.

PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; SILVA, M.G.; RAMALHO, J.C. Seasonal vegetative growth of different age branches of Conilon coffee tree. *Semina: Ciências Agrárias*, v.31, n.3, p.619-626, 2010.

PARTELLI, F.L.; VIEIRA, H.D.; VIANA, A.P.; BATISTA-SANTOS, P.; RODRIGUES, A.P.D.; LEITÃO, A.E.; RAMALHO, J.C. Low temperature impact on photosynthetic parameters of coffee genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.44, n.11, p.1404-1415, 2009.

PREZOTTI, L.C. et al. Calagem e adubação. In: FERRÃO, R. G. et al. (Ed.). *Café conilon*. Vitória: Incaper, 2007. 331-373p.

PREZOTTI, L.C.; BRAGANÇA, S. M. Concentração de massa seca, N, P e K em diferentes materiais genéticos de café conilon. *Coffee Science*, Lavras, v.8, n.3, p.284-294, 2013.

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

R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMALHO, J.C.; QUARTIN, V.L.; LEITÃO, E.; CAMPOS, P.S.; CARELLI, M.L. C.; FAHL, J.I.; NUNES, M.A. Cold Acclimation Ability and Photosynthesis among Species of the Tropical *Coffea* Genus. *Plant Biology*, v.5, n.6, p.631-641, 2003.

RODRIGUES, W.N.; TOMAZ, M.A.; FERRÃO, R.G.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.; MIRANDA, F.D. Estimativa de parâmetros genéticos de grupos de clones de café Conilon. *Coffee Science*, n.7, p.177-186, 2012.

RODRIGUES, W.N.; TOMAZ, M.A.; FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A. Diversity among genotypes of conilon coffee selected in Espírito Santo state. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.31, n.6, p.1643-1650, 2015.

SILVA, E.A.; DAMATTA, F.M.; DUCATTI, C.; REGAZZI, A.J.; BARROS, R.S. Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis of Arabica coffee trees. *Field Crops Research*, Amsterdam, v.89, n.2-3, p.349-357, 2004.

SILVA, S.C.; SANTANA, N.M.P.; PELEGRINI, J.C. Caracterização Climática do Estado de Goiás. In: FILHO, A.R.; CHIARELOTO, R.D.; MAGALHÃES, L.F.; RODRIGUES, A.P.; MOREIRA, M.L.O. *Série Geologia e Mineração*. Goiânia: CDU 551.58 (817.3), n.3, p.133, 2006. Disponível em:

- <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABb7cAL/caracterizacao-climatica-estado-goias> Acesso em: 4 de novembro de 2016.
- SILVEIRA, J.S.M.; CARVALHO, C.H.S.de.; (1993) BRAGANÇA, S.M.; FONSECA, A. F. A. da. A poda do café conilon. Vitória, ES: Emcapa, 14p. (Emcapa – Documento 80).
- SILVEIRA, J.S.M. Uma nova alternativa de manejo da poda do café conilon. Revista Procampo, Linhares, ES: 2008.
- TAIZ L & ZEIGER E (2002) Plant physiology 3rd ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc., Publishers. 690p.
- TAIZ L, ZEIGER E, MØLLER IM AND MURPHY A (2015). Plant Physiology and Development. 6th edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- TEDESCO, M.J. et al. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p. (Boletim Técnico de Solos, 5).
- WADT, P.G.S.; DIAS, J.R.M. Normas DRIS regionais e inter-regionais na avaliação nutricional de café Conilon. Pesquisa Agropecuária Tropical, n.47, p. 822-830, 2012.
- WADT, P.G.S.; NOVAIS, R.F.D.; ALVAREZ; V.H.; BARROS, N.F.D. Variations on the nutritional status of eucalypt as influenced by the genetic material and age of tree. Pesquisa Agropecuária Brasileira, n.34, p.1796-1803, 1999.
- WELCH, R.M. Micronutrient nutrition of plants. Critical Reviews in Plant Sciences, n.14, p.49-82, 1995.

Capítulo 5

Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de *Coffea canephora* cultivados em altitude elevada

Resumo - Estudos relacionados as mudanças climáticas indicam que o aumento gradativo da temperatura terrestre irá mudar o zoneamento de cultivo de café, em especial *Coffea canephora*. Neste caso algumas áreas aptas ao seu cultivo, poderão se tornar inapropriadas, fato motivado pelas elevadas temperaturas. Neste caso imagina-se que o cultivo de conilon em altitudes elevadas pode ser uma opção para implementar o cultivo de *Coffea canephora*, amenizando os possíveis efeitos de perda de áreas produtivas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produtividade, adaptabilidade e estabilidade de 28 genótipos de *C. canephora* cultivados em condições climáticas onde a temperatura mínima é o fator limitante ao Conilon. O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano Campus Morrinhos, Goiás. Localizado a uma altitude de aproximadamente 750 metros, a região de Morrinhos - GO. Para implantar a lavoura experimental foram selecionados 28 materiais genéticos de *C. canephora*. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco plantas. Foi averiguado a interação G x A, utilizando-se análises de estabilidade e adaptabilidade baseado no modelo misto de máxima verossimilhança restrita / melhor predição linear (REML/BLUP). Para estimativas de adaptabilidade e estabilidade dos diferentes genótipos de *C. canephora*, foi considerado dados de quatro colheitas. A herdabilidade de genótipos apresentarem alta magnitude, resultado que eleva a precisão na seleção e indicação de genótipos. Destacaram-se seis materiais genéticos de *C. canephora* (3V), (NV2), (NV8), (P1), (VERDIM TA) e (A1), quanto à produtividade, adaptabilidade e estabilidade, em local com altitude elevada.

Abstract - Studies related to climate change indicate that the gradual increase in terrestrial temperature will change the zoning of coffee cultivation, especially *Coffea canephora*. In this case some areas suitable for cultivation may become inappropriate, a fact motivated by the high temperatures. In this case it is imagined that the cultivation of conilon at high altitudes may be an option to implement the cultivation of *Coffea canephora*, mitigating the possible effects of loss of productive areas. The objective of this work was to evaluate the productivity, adaptability and stability of 28 genotypes of *C. canephora* cultivated in climatic conditions where the minimum temperature is the limiting factor for Conilon. The experiment was carried out at the Federal Institute of Education, Science and Technology Goiano Campus Morrinhos, Goiás. Located at an altitude of approximately 750 meters, the Morrinhos - GO region. In order to implant the experimental plantation, 28 genetic materials of *C. canephora* were selected. The design was a randomized block design, with four replications, each replicate being composed of five plants. The G x A interaction was investigated using stability and adaptability analyzes based on the mixed model of maximum likelihood / best linear prediction (REML / BLUP). For estimates of adaptability and stability of the different *C. canephora* genotypes, data from four harvests were considered. The heritability of genotypes presents high magnitude, a result that increases the precision in the selection and indication of genotypes. Six genetic materials of *Coffea canephora* (3V), (NV2), (NV8), (P1), (VERDIM TA) and (A1) were highlighted, regarding productivity, adaptability and stability, in a local with high altitude.

and (A1) were highlighted for productivity, adaptability and stability at a high altitude site.

1. Introdução

O cafeeiro Conilon apresenta maior taxa de crescimento quando cultivado em climas com temperaturas mínimas acima de 17°C (PARTELLI et al., 2013; COVRE et al., 2016). Portanto, imagina-se que o cultivo de *C. canephora* em região de altitude elevada possa ser prejudicado, em virtude da limitação de alguns de seus genótipos, principalmente, nos meses mais frios do inverno, devido à falta de adaptação.

Entretanto, com o advento das mudanças climáticas ocorridas nos últimos tempos, com o aumento de temperatura e secas prolongadas, derivadas do aumento do nível de CO₂ atmosférico (LONG; ORT, 2010 DaMATTA et al., 2010, CAMARGO, 2010; IPCC, 2014), estudos evidenciam alterações significativas no zoneamento agroclimático do cafeeiro, observando-se fortes perdas de áreas adequadas ao cultivo, em importantes países produtores de café, tal como no Brasil e Vietnã (BUNN et al., 2015).

Essas alterações podem ser atribuídas as elevadas temperaturas acima de 42°C, as quais ocasionam aumento significativo da fotoinibição em plantas de *Coffea spp.*, tendo em vista que nesta temperatura não foi observado um reforço global do sistema antioxidativo (Sintetizado), porém em termos de expressão de genes ocorre a regulação positiva dos mecanismos de protecção (HSP70, chaperoninas, ELIP e APX Cyt), bem como o teor de rafinose, os quais em conjunto constituem uma linha de defesa contra o estresse promovido pelo calor (Martins et al., 2016).

Dessa forma, imagina-se coerente a ideia de se testar genótipos *C. canephora* em locais com altitude elevada. Considerando que a espécie *C. canephora* possui alta variabilidade genética devido a alogamia da espécie, e portanto, podem existir genótipos capazes de explorar diferentes mecanismos fisiológicos como estratégia para tolerar as baixas temperaturas (PARTELLI et

al., 2011; 2013), e neste caso a adaptação pode ser alcançada por meio de um programa de melhoramento que vise a obtenção de cultivares adaptadas as condições climáticas de elevadas altitudes.

Contudo, deve-se considerar que em programas de melhoramento genético de café cultiva-se diferentes plantas em diferentes condições climáticas, e sendo assim, as respostas dessas cultivares geralmente são diferenciadas, quando comparados espacialmente, através de vários ambientes, ou temporalmente, ao longo de diversas safras, esse comportamento acontece devido ao fenômeno que conhecemos como a interação genótipos x ambientes (CUCOLOTTO et al., 2007).

A interação genótipos X ambientes pode ser simples, o que possibilita a avaliação do real impacto de seleção e assegura alto grau de confiabilidade na recomendação de genótipos, maximizando a produtividade e outros atributos agronômicos de interesse para um determinado local ou grupo de ambientes (SILVA et al. 2011; ROSADO et al. 2012; CRUZ et al. 2014; SANTOS et al., 2016) ou complexa onde evidencia-se alterações no ranqueamento dos genótipos através dos diversos ambientes avaliados, trazendo dificuldade no momento da recomendação dos cultivares. Além da interação entre genótipos X ambientes, o Café apresenta uma circunstância agravante, é uma cultura bianual, em que existe variabilidade temporal na produtividade das plantas em diferentes colheitas.

Diante do exposto objetivou-se com este trabalho avaliar a produtividade, adaptabilidade e estabilidade de 28 genótipos de *C. canephora* cultivados em condições climáticas de altitude elevada.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano Campus Morrinhos, Goiás. Localizado a uma altitude de aproximadamente 750 metros, a região de Morrinhos é caracterizada por apresentar um déficit hídrico a partir do mês de abril até o mês de outubro, tem

uma topografia plana e relevo ondulado, a temperatura média anual de 20°C, sendo que a temperatura mínima do ar varia de 10°C (julho) a 20°C (nos meses de inverno), e a média de temperatura anual mínima é 18°C. Na figura 1 pode-se observar os dados climáticos médios para cada mês do ano, considerando os quatro anos (2013, 2014, 2015, 2016) de avaliação deste experimento.

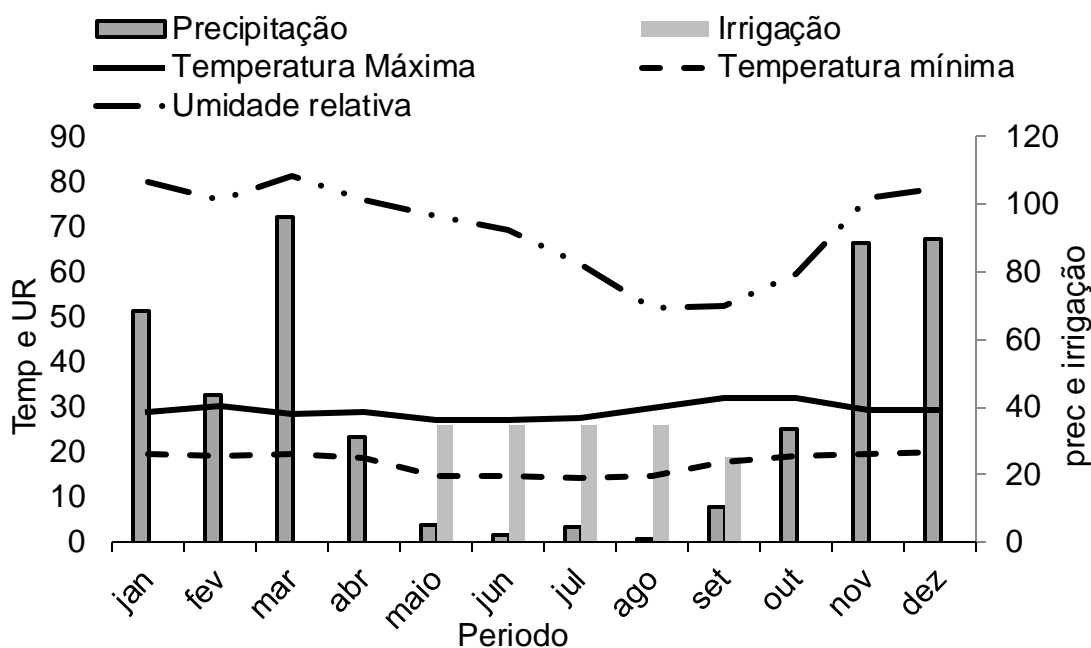


Figura 1 - Valores médios mensais referentes as temperaturas (Temp) expressos em°C, Umidade Relativa do Ar (UR) expresso em (%), precipitação média (prec) e irrigação expressos em mm, durante o período de experimentação, Morrinhos - GO.

Para implantar a lavoura experimental foram selecionados 28 materiais genéticos de *C. canephora* (Tabela 1). Dos 28 materiais genéticos utilizados, os 25 primeiros foram clonais e três últimos produzidos por sementes. As mudas de *C. canephora* utilizadas no plantio foram produzidas em viveiro certificado pelo MAPA, localizado no município de Marilândia, região norte do Espírito Santo. O espaçamento utilizado para plantio foi de 3,5m X 1m, ocupando 3,5 m² por planta.

Tabela 1 - Lista dos 28 acessos dos genótipos de *C. canephora* utilizados nesta experimentação, Instituto Federal Goiano, Morrinhos - GO.

| A | CA | A | CA |
|----------|-----------|---|-------------|
| 1V | 1 | NV2 | 14 |
| 2V | 2 | 14 da EMCAPA 8121 (Bragança et al., 2001) | 15 |
| 3V | 3 | Clone 18 | 16 |
| 4V | 4 | NV1 | 17 |
| 5V | 5 | NV8 | 18 |
| 6V | 6 | P1 | 19 |
| 7V | 7 | 3 da EMCAPA 8121 | 20 |
| 8V | 8 | P2 | 21 |
| 9V | 9 | 4 da Bahia | 22 |
| 10V | 10 | NV3 | 23 |
| 11V | 11 | Verdim TA | 24 |
| 12V | 12 | A1 | 25 |
| 13V | 13 | SEMENTES ROBUSTÃO | 26, 27 e 28 |

(A): Acessos; (CA): Código dos acessos, correspondentes aos 28 genótipos de *C. canephora* analisados neste experimento.

O delineamento utilizado foi em blocos casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco plantas. Os tratos culturais correspondentes a adubação foram realizados conforme as orientações técnicas para a cultura do cafeeiro seguindo as recomendações conforme a produtividade esperada (PREZOTTI et al., 2007). Foram realizadas podas para controle de ramos execivos, mantendo o padrão de Ca. 12.000-15.000 hastes/ha (FONSECA et al., 2007; SILVEIRA et al., 1993; SILVEIRA et al., 2008). Em cada um dos quatro anos experimentais foram realizadas uma capina manual (trilhar o local de adubação), uma capina mecanizada e uma capina química, utilizando o ingrediente ativo Glyphosate, na dose de 1,0 L/hectare do produto comercial. Não foram aplicados micronutrientes, inseticidas ou fungicidas, durante os quatro anos de estudo. A área experimental foi irrigada durante os anos referentes as colheitas de 2013 e 2014, porém nas colheitas de 2015 e 2016 a lavoura experimental não foi irrigada. Para analisar a estabilidade e adaptabilidade dos materiais genéticos avaliados neste estudo foram utilizados dados de produtividades correspondentes a quatro colheitas (2013, 2014, 2015, 2016) (Tabela 2).

Tabela 2 - Média de quatro repetições em cada ano de avaliação da produtividade de 28 genótipos de *C. canephora* cultivados sob altitude elevada, Morrinhos-GO.

| Genótipos | Produtividade em sc ha ⁻¹ | | | |
|-----------|--------------------------------------|------|-------|------|
| | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 |
| 1 | 8.0 | 23.5 | 18.4 | 0.2 |
| 2 | 0.0 | 11.0 | 14.5 | 10.0 |
| 3 | 29.0 | 39.2 | 56.1 | 32.9 |
| 4 | 2.0 | 30.5 | 28.1 | 1.0 |
| 5 | 7.7 | 25.8 | 41.4 | 1.9 |
| 6 | 10.5 | 28.1 | 10.5 | 4.2 |
| 7 | 9.2 | 25.1 | 3.4 | 0.3 |
| 8 | 14.7 | 39.3 | 37.2 | 0.4 |
| 9 | 0.0 | 18.7 | 39.2 | 1.8 |
| 10 | 12.5 | 34.3 | 34.2 | 1.7 |
| 11 | 16.0 | 33.6 | 39.0 | 5.1 |
| 12 | 11.6 | 46.8 | 17.1 | 1.5 |
| 13 | 4.9 | 53.7 | 39.6 | 13.2 |
| 14 | 45.0 | 54.7 | 100.9 | 39.0 |
| 15 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 16 | 3.5 | 25.5 | 0.0 | 0.6 |
| 17 | 5.8 | 34.7 | 44.6 | 8.3 |
| 18 | 22.8 | 66.0 | 77.8 | 26.1 |
| 19 | 10.5 | 78.2 | 40.3 | 17.8 |
| 20 | 9.5 | 33.9 | 15.5 | 0.0 |
| 21 | 6.8 | 13.5 | 57.2 | 28.5 |
| 22 | 7.0 | 30.3 | 67.6 | 1.2 |
| 23 | 16.2 | 38.5 | 23.3 | 4.3 |
| 24 | 13.8 | 43.6 | 99.1 | 50.6 |
| 25 | 50.4 | 83.3 | 61.2 | 39.1 |
| 26 | 2.4 | 26.2 | 36.8 | 16.0 |
| 27 | 2.7 | 23.0 | 35.3 | 1.8 |
| 28 | 3.2 | 12.4 | 22.9 | 2.2 |

Para averiguar a interação G x A, foram combinadas análises de estabilidade e adaptabilidade através do modelo misto de máxima verossimilhança restrita / melhor predição linear (REML/BLUP). Esse método tem sido utilizado com sucesso, principalmente em culturas perenes (MAIA et al., 2009; ROSADO et al., 2012). O indivíduo BLUP é adequado para predição de valores genéticos compostos, basicamente, de um modelo estatístico

aleatório efeito associado, com observações fenotípicas, ajustando-se os dados para os efeitos fixos e a quantidade desigual de informação sobre as parcelas, quando for o caso.

As estimativas de parâmetros genéticos, foram obtidas por meio de análise envolvendo o procedimento REML/BLUP, utilizando o modelo estatístico 55 do software Selegen (Resende, 2007a). Para estimativas de adaptabilidade e estabilidade dos diferentes genótipos de *C. canephora*, foi considerado dados de quatro colheitas. A seleção de genótipos superiores foram baseadas na média harmônica da performance relativa dos valores genéticos (MHPRVG), utilizando-se 3 estratégias: seleção com base no valor genético predito, tendo considerado o desempenho médio em todas as colheitas (sem efeito de interação); seleção com base no valor genético predito, tendo considerado o desempenho dos genótipos em cada colheita (com efeito da interação); e seleção simultânea para a produção, a estabilidade (MHVG) e adaptabilidade (PRVG).

3. Resultados e discussão

Em programas de melhoramento vegetal, as etapas de planejamento e condução dos experimentos, podem ser fundamentadas pela interpretação das estimativas dos parâmetros genéticos, as quais, permitem inferir a qualidade experimental, a proporção da variância total que é devida às diferenças genéticas e por fim identifica a predição do ganho com o plantio de clones selecionados (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004; RAMALHO et al., 2016).

Observa-se em geral valores elevados para variância genética (V_g), com destaque para o maior valor (549,49) de V_g observado na colheita de 2015 (Tabela 3). Nota-se que houve predominância das variações genotípicas em relação as variações ambientais, no que se trata da expressão da característica café beneficiado, quando avaliada de maneira conjunta ou por colheita (Tabela 3). Estimativas elevadas de variância genotípica em *Coffea canephora* também foram relatadas por outros autores (RAMALHO et al., 2011; RAMALHO et al., 2016). Deve se considerar que estimativas de baixa magnitude também são observadas em estudos envolvendo diferentes genótipos de *Coffea spp.*

cultivados em diferentes condições edafoclimáticas (CARIAS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013).

O parâmetro herdabilidade média dos clones (h^2_{mc}) apresenta valores que podem ser considerados elevados tais como, nas colheitas 2013 e 2015 (Tabela 3) em que observa-se o mesmo valor (0,92) de (h^2_{mc}). Para as colheitas 2014 e 2016 observa-se respectivamente os valores 0,83 e 0,88 no que se refere ao parâmetro (h^2_{mc}). Os valores observados para o parâmetro (h^2_{mc}) estão semelhantes com o observado por Ramalho et al., 2016, em que observaram (h^2_{mc}) em média de 0,94 em estudo envolvendo estudos de parâmetros genéticos da produtividade de café beneficiado, avaliados em quatro safras para seleção de clones de cafeeiro 'Conilon', em campo experimental de Ouro Preto do Oeste (RO). As estimativas de (h^2_{mc}) também foram comparáveis com as obtidas por Ferrão et al. (2008) em *C. canephora*, com indicativo de predominância do componente genético na expressão da característica produtividade de grão de café beneficiado.

Observa-se pela análise conjunta dos dados que, as variações atribuídas aos genótipos foram maiores quando comparada as variâncias ocorridas para ambientes (V_p) e interação genótipo X ambientes (V_{gm}), sendo o valor (17,15) de (V_p) menor que o valor de 115,55 de (V_{gm}) (Tabela 3). Esses resultados podem ser entendidos considerando os resultados observados por Fehr (1987), em que a herdabilidade elevada está associada com maior variância genética aditiva, menor variação ambiental e menor interação genótipo e ambiente.

Sobre a acurácia média da seleção dos genótipos foi observado os valores 0,93; 0,88; 0,93 e 0,90 respectivamente para as colheitas 2013, 2014, 2015 e 2016. O maior valor de 0,93 para acurácia média da seleção de genótipos foi observado para as colheitas 2013 e 2015, sendo que a estimativa conjunta das quatro colheitas revela valor de 0,87 de acurácia média. O fato de se obter valor elevados para o parâmetro acurácia é relevante tendo em vista que, esse parâmetro tem o intuito de auxiliar no correto ordenamento das cultivares para fins de seleção e na eficácia da inferência acerca do valor genotípico da cultivar, devido ao fato de não depender apenas da magnitude da variação residual e do

número de repetições, mas também da proporção entre as variações de natureza genética e residual associadas ao caráter em avaliação (RESENDE, 2002; RESENDE & DUARTE, 2007b).

Deve-se considerar que a correlação entre os valores genotípicos verdadeiros e os valores estimados, interpretados pela acurácia do procedimento de seleção, quantifica a eficácia da inferência do valor genotípico de cada clone em função do número de medições (safras) avaliadas (CECON et al., 2008; ROCHA et al., 2009). Segundo classificação de Resende (2002), o valor 0,86 da acurácia da seleção entre os clones evidenciou precisão nas inferências dos valores genotípicos, indicando que a condução experimental foi apropriada e a avaliações das quatro colheitas suficientes para a caracterização dos genótipos superiores.

Os valores de coeficientes de variação genética foram sempre maiores quando comparados ao coeficientes de variação ambiental independente da colheita avaliada, conseqüentemente para todas as quatro colheitas avaliadas nestes estudo, observa-se que os resultados da relação da variação genética / variação ambiental (CV_r) foram sempre com valores acima de um, sendo o maior valor 1,72 obtido na colheita de 2015. Os valores de CV_r variaram significativamente entre as colheitas avaliadas neste estudo, esse comportamento pode ser explicado pela bienalidade do cafeeiro (Tabela 3).

A alternância na produtividade de grãos é uma característica fisiológica do cafeeiro, que necessita vegetar em um ano para produzir no ano seguinte (RENA & MAESTRI, 1987). Segundo BARROS et al., (1999) e PICINI et al., (1999), a bienalidade da produção acontece devido à relação fonte-dreno entre folhas e frutos, resultado do maior direcionamento de fotoassimilados para os frutos principalmente nos anos de produção elevada. Essa oscilação na produção de grão é uma das causas mais importantes para a ocorrência dos efeitos significativos da interação genótipos x anos, que também pode ser estudada numa interação de genótipos x safras (LEROY et al., 1994). Faz parte da fisiologia do cafeeiro vegetar em um ano para produzir no ano seguinte, a bienalidade também apresenta forte influência ambiental, sendo afetada pelas

práticas de manejo do cafezal e pelas características climáticas (ROCHA et al., 2015).

Tabela 3 - Estimativas de parâmetros genéticos para a produtividade (sacas de 60 Kg ha⁻¹) de grãos de café beneficiado, obtidos da avaliação de 28 genótipos de *C. canephora* cultivados em altitude elevada, em quatro safras, no município de Morrinhos - GO.

| Parâmetros genéticos | Colheitas | | | | Conjunta |
|---------------------------------|-----------|--------|--------|--------|----------|
| | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | |
| Vg | 134.1 | 273.44 | 549.49 | 176.89 | 170.95 |
| Vp | --- | --- | --- | --- | 17.15 |
| Vgm | --- | --- | --- | --- | 115.55 |
| Ve | 46.99 | 226.31 | 185.27 | 95.39 | 124.28 |
| Vf | 181.1 | 499.75 | 734.76 | 272.28 | 427.93 |
| (h ² _{mc}) | 0.92 | 0.83 | 0.92 | 0.88 | 0.81 |
| r | --- | --- | --- | --- | 0.44 |
| c ² _{perm} | --- | --- | --- | --- | 0.04 |
| c ² _{gm} | --- | --- | --- | --- | 0.27 |
| r _{gsafra} | --- | --- | --- | --- | 0.60 |
| Acurácia Média | 0.93 | 0.88 | 0.93 | 0.90 | 0.87 |
| CVg (%) | 90.55 | 46.04 | 57.87 | 112.95 | 52.56 |
| CVe (%) | 53.6 | 41.88 | 33.6 | 82.94 | 44.81 |
| CVr | 1.69 | 1.10 | 1.72 | 1.36 | 1.17 |

Vg: Variância genética entre genótipos; Vp: Variância ambiental entre parcelas; Vgm: Variância da interação genótipos X colheitas; Ve: Variância residual entre parcelas; Vf: Variância fenotípica individual; Herdabilidade individual no sentido restrito do bloco (h²_{mc}); r: coeficiente de repetibilidade individual. c²_{perm}: Coeficiente de determinação dos efeitos de parcela; c²_{gm}: coeficiente de determinação dos efeitos da interação genótipos x safras; r_{gsafra}: correlação genética através das safras; CVg(%): Coeficiente de variação genético; CVe(%): Coeficiente de variação ambiental; CVr: Relação entre coeficiente de variação genético / coeficiente de variação ambiental.

O conhecimento do coeficiente de repetibilidade das características de interesse permite avaliar o dispêndio de tempo necessário para que a seleção de indivíduos geneticamente superiores seja feita com a acurácia desejada pelo pesquisador (BRUNA et al., 2012). Os coeficientes de repetibilidade individual conjunta obtidos neste estudo envolvendo análise de produtividade de grãos de café beneficiado em quatro colheitas apresentam o valor de 45% (Tabela 3). Conforme a classificação de Resende (2002), o valor de 45% de repetibilidade conjunta representa magnitude média. Os resultados obtidos para coeficiente de repetibilidade não foram considerados elevados, neste caso deve-se considerar

que para incrementar os resultados relativos a acurácia experimental, sugere-se a adequação da experimentação pela utilização de maior número de medições por planta (RESENDE, 2002).

Observa-se pelo valor 0.60 de correlação genética através das safras (r_{gsafra}), revela nível moderado de interação complexa (Tabela 3). Esse comportamento indica que existe diferenças nas classificações dos genótipos considerando as diferentes colheitas, ou seja um determinado genótipo que é classificado como primeiro na colheita de 2013, não necessariamente será o primeiro genótipo classificado na colheita 2014.

Na tabela 4 são apresentados os valores genotípicos médios ($\hat{\mu} + \tilde{g}$) para cada uma das quatro safras avaliadas neste estudo. Os seis melhores genótipos que podem ser considerados diferenciados e selecionados segundo BLUP foram: (3V), (NV2), (NV8), (P1), (VERDIM TA) e (A1). Com base nos resultados obtidos sugere-se a possibilidade de cultivo desses seis genótipos em ambientes diferentes do local onde foi estabelecido este experimento, considerando o fato de que os genótipos foram ordenados com base em valores genotípicos livres da interação genótipo x ambiente.

De acordo com a CONAB (2017), na safra de 2016 o Brasil apresenta-se com uma produtividade de 18,81 sacas/hectare, considerando os dados sobre produtividade em diferentes safras analisado no contexto deste estudo, pode-se notar que 17 dos 28 genótipos de *C. canephora* analisados neste estudo apresentam-se com produtividade média superior quando comparada a média de produtividade brasileira. Neste sentido pode-se indicar que existem matérias genéticas adaptáveis as condições ambientais em que foram avaliados, deve-se considerar que esses recursos genéticos podem ser importantes para implementar a expressividade da produção de *C. canephora*.

Tabela 4 - Estimativas dos valores genéticos relacionados ao caráter produtividade (sacas de 60 Kg ha⁻¹) de grãos de café beneficiado, não sendo capitalizado a interação genótipo x ambiente, obtidas da avaliação de 28 genótipos de *C. canephora* cultivados em altitude elevada, em quatro safras, no município de Morrinhos - GO.

| Clones | Safras | | | | VG(Médio) | Acurácia |
|--------------------|--|--|--|--|-------------------------|----------|
| | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | | |
| | $\hat{\mu}_1 + \tilde{g} + \tilde{g}s$ | $\hat{\mu}_2 + \tilde{g} + \tilde{g}s$ | $\hat{\mu}_3 + \tilde{g} + \tilde{g}s$ | $\hat{\mu}_4 + \tilde{g} + \tilde{g}s$ | $\hat{\mu} + \tilde{g}$ | |
| 14 | 43.41 | 55.84 | 93.45 | 37.85 | 52.90 | 0.88 |
| 25 | 45.35 | 78.56 | 64.44 | 39.39 | 52.30 | 0.87 |
| 24 | 17.66 | 47.58 | 87.31 | 45.18 | 45.88 | 0.87 |
| 18 | 25.76 | 61.31 | 70.81 | 26.33 | 42.99 | 0.88 |
| 3 | 26.42 | 40.56 | 53.43 | 28.68 | 35.48 | 0.88 |
| 19 | 12.54 | 70.98 | 42.06 | 16.84 | 34.05 | 0.88 |
| 13 | 6.83 | 50.43 | 40.25 | 13.25 | 27.28 | 0.88 |
| 22 | 9.10 | 30.66 | 59.39 | 5.38 | 25.95 | 0.87 |
| 21 | 6.97 | 17.91 | 53.67 | 22.33 | 25.17 | 0.88 |
| 17 | 6.94 | 36.22 | 43.55 | 8.79 | 24.02 | 0.88 |
| 11 | 14.92 | 33.89 | 39.07 | 6.16 | 23.71 | 0.88 |
| 8 | 12.60 | 38.24 | 37.48 | 2.59 | 23.04 | 0.88 |
| 23 | 14.62 | 37.29 | 26.56 | 5.11 | 21.47 | 0.88 |
| 10 | 10.34 | 33.91 | 34.74 | 2.99 | 21.13 | 0.88 |
| 26 | 3.84 | 27.42 | 36.70 | 10.22 | 20.31 | 0.88 |
| 12 | 10.74 | 43.62 | 21.09 | 2.42 | 20.25 | 0.87 |
| 5 | 4.81 | 26.95 | 37.91 | 4.50 | 19.46 | 0.87 |
| 9 | --- | 22.26 | 38.12 | 2.53 | 18.16 | 0.85 |
| 20 | 8.67 | 32.20 | 21.59 | --- | 17.88 | 0.85 |
| 16 | 3.90 | 26.08 | --- | 2.49 | 17.60 | 0.85 |
| 27 | 3.24 | 23.38 | 36.02 | 2.51 | 17.53 | 0.87 |
| 4 | 2.53 | 28.59 | 28.22 | 1.60 | 16.63 | 0.88 |
| 6 | 9.03 | 27.97 | 15.31 | 3.95 | 15.63 | 0.88 |
| 1 | 6.97 | 24.30 | 21.21 | 1.76 | 15.20 | 0.88 |
| 7 | 7.53 | 25.10 | 11.13 | 0.40 | 13.04 | 0.88 |
| 28 | 2.72 | 15.07 | 24.24 | 1.10 | 12.82 | 0.88 |
| 2 | --- | 15.41 | 16.86 | 7.16 | 11.77 | 0.85 |
| Média Geral | 11.91 | 35.99 | 40.28 | 11.33 | 24.88 | --- |
| Ganho Genético (%) | 88.16 | 45.71 | 51.02 | 119.69 | 47.14 | --- |

Na tabela 5 verifica-se o padrão diferenciado entre as estimativas dos valores genotípicos para o ambiente médio, capitalizando-se a interação média ($u+g+gem$), pelo método MHPRVG, em que observa-se superioridade para seis genótipos ((3V), (NV2), (NV8), (P1), (VERDIM TA) e (A1)), pois esses apresentam-se sempre entre as primeiras seis colocações.

Tabela 5 - Valores genotípicos capitalizando-se a interação genótipo x ambiente média (u+g+gem), estabilidade de valores genotípicos (MHVG), adaptabilidade de valores genotípicos (PRVG) e estabilidade e adaptabilidade de valores genotípicos (MHPRVG) para a característica produtividade de grãos de café, da avaliação de 28 genótipos de *C. canephora* cultivados em altitude elevada, em quatro safras, no município de Morrinhos - GO.

| Clones | u+g+gem | Clones | MHVG | Clones | PRVG*MG | Clones | MHPRVG*MG |
|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|-----------|
| 14 | 57.6377 | 25 | 52.8514 | 25 | 68.8408 | 25 | 60.922 |
| 25 | 56.9359 | 14 | 51.238 | 14 | 67.5316 | 14 | 60.3389 |
| 24 | 49.4337 | 18 | 37.3067 | 24 | 55.7317 | 18 | 48.5845 |
| 18 | 46.0564 | 24 | 35.9614 | 18 | 49.4437 | 24 | 46.4405 |
| 3 | 37.2704 | 3 | 34.4538 | 3 | 44.8015 | 3 | 40.01 |
| 19 | 35.6047 | 19 | 22.6007 | 19 | 34.5551 | 19 | 32.2354 |
| 13 | 27.6914 | 20 | 15.5681 | 21 | 27.2798 | 13 | 23.08 |
| 22 | 26.1338 | 21 | 15.2204 | 13 | 25.7738 | 11 | 21.0425 |
| 21 | 25.219 | 13 | 15.0119 | 11 | 23.0647 | 17 | 20.2172 |
| 17 | 23.8748 | 11 | 14.0663 | 22 | 22.1737 | 21 | 19.9949 |
| 11 | 23.5102 | 17 | 12.9727 | 17 | 21.4351 | 22 | 18.8928 |
| 8 | 22.7287 | 23 | 12.1706 | 23 | 20.9868 | 23 | 18.046 |
| 23 | 20.8954 | 22 | 11.5838 | 8 | 20.3985 | 20 | 17.1297 |
| 10 | 20.4982 | 2 | 11.3728 | 10 | 18.2707 | 26 | 15.0353 |
| 26 | 19.5433 | 26 | 9.4807 | 26 | 18.0188 | 10 | 13.9058 |
| 12 | 19.4666 | 6 | 8.609 | 20 | 17.9017 | 8 | 13.568 |
| 5 | 18.5448 | 10 | 8.1801 | 12 | 17.7309 | 5 | 13.4672 |
| 9 | 17.0263 | 5 | 8.1058 | 5 | 15.4955 | 6 | 12.2851 |
| 20 | 16.6965 | 8 | 7.7183 | 9 | 14.8284 | 2 | 11.8349 |
| 16 | 16.367 | 12 | 6.937 | 6 | 14.0876 | 12 | 11.6739 |
| 27 | 16.2878 | 9 | 6.4304 | 27 | 12.6738 | 9 | 10.4345 |
| 4 | 15.2338 | 27 | 5.1494 | 2 | 12.2654 | 27 | 9.1824 |
| 6 | 14.0679 | 1 | 5.0048 | 1 | 12.0818 | 1 | 8.6403 |
| 1 | 13.5604 | 16 | 4.3056 | 4 | 11.4959 | 16 | 8.3043 |
| 7 | 11.0414 | 4 | 3.6632 | 16 | 10.5452 | 4 | 6.869 |
| 28 | 10.7795 | 28 | 2.8836 | 7 | 10.2112 | 28 | 5.3049 |
| 2 | 9.5591 | 7 | 1.4493 | 28 | 8.3677 | 7 | 2.849 |

MG = média geral

Nota-se que os resultados apresentados nas tabelas 4 e 5 indicam valores diferentes quando comparadas entre si, no entanto nota-se semelhança na indicação dos melhores materiais genéticos avaliados para este estudo. Para os seis genótipos considerados superiores neste estudo, observa-se maiores valores para as estimativas de parâmetros genéticos que envolvem a interação genótipo X ambiente, quando comparado aos valores de estimativas de

parâmetros genéticos que não envolvem a interação genótipo X ambiente. Neste caso deve-se considerar que os valores para estimativas obtidas envolvendo a interação genótipo X ambiente só serão realmente aplicáveis caso os clones sejam plantados em áreas com o mesmo padrão de interação genótipo x ambiente da rede experimental dessa avaliação, caso contrário, as inferências sobre médias genóticas baseadas nas estimativas obtidas sem a utilização da interação genótipos X ambiente são mais seguras para serem utilizadas como referência (BASTOS et al., 2007).

4. Conclusões

No que se refere a produtividade de café beneficiado, foi constatado expressiva variabilidade genética entre os genótipos avaliados neste estudo, condição que favorece a obtenção de ganhos com a seleção clonal.

A herdabilidade de genótipos apresentarem alta magnitude, resultado que eleva a precisão e consecutivamente o sucesso na seleção e indicação de genótipos.

Entre os genótipos avaliados, destacaram-se seis materiais genéticos (3V), (NV2), (NV8), (P1), (VERDIM TA) e (A1), quanto à produtividade, adaptabilidade e estabilidade.

Existem genótipos de *C. canephora*, avaliados neste estudo, que apresentam potencial para ser utilizado com êxito em programas de melhoramento genético, visando o cultivo de *C. canephora* em elevada altitude.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Espírito Santo pelo apoio a esta investigação, ao Instituto Federal Goiano de Morrinhos - GO pela disponibilização de recursos experimentais, ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural por disponibilizar as mudas de parte dos acessos de genótipos de *C. canephora* analisados neste estudo, e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo por disponibilizar recursos financeiros. Ao CNPq por financiar a implantação da lavoura.

6. Referências

- BARROS, R.S.; MAESTRI, M.; RENA, A.B. Physiology of growth and production of the coffee tree – A review. *Journal of Coffee Research*, v. 27, p.1-54, 1999.
- BASTOS, I.T.; BARBOSA, M.H.P.; RESENDE, M.D.V.; PETERNELLI, L.A.; SILVEIRA, L.C.I.; DONDA, L.R.; FORTUNATO, A.A.; COSTA, P.M.A.; FIGUEIREDO, I.C.R. Avaliação da interação genótipo x ambiente em cana-de-açúcar via modelos mistos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.37, n.4, p.195-203, 2007.
- BRAGANÇA, S.M.; DECARVALHO, C.H.S.; DAFONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R. G. Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, n.5, p.765-770, 2001.
- BRUNA, D.E.; MORETO, A.L.; DALBÓ, M.A. Uso do coeficiente de repetibilidade na seleção de clones de pessegueiro para o litoral sul de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.34, p.206-215, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000100028>
- BUNN, C.; LADERACH, P.; RIVERA, O. O.; KIRSCHKE, D. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Climatic Change*, v. 129, n. 1-2, p. 89-101, 2015.
- CAMARGO, M.B.P. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. *Bragantia*, v.69, n.1, p.239-247, 2010.
- CARIAS, C.M.D.O.M.; TOMAZ, M.A.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.D.; FERRÃO, R.G.; GONÇALVES, L.S.A. Produtividade de grãos de cafeeiro conilon de diferentes grupos de maturação pelo procedimento REML/BLUP. *Ciências Agrárias*, v.35, n.2, p.707-718, 2014.
- CECON, P.R.; SILVA, F.F.; FERREIRA, A.; FERRÃO, R.G.; CARNEIRO, A.P. S.; DETMANN, E.; FARIA, P.N.; MORAIS, T.S.D.S. Repeated measure analysis in the clonal evaluation in 'Conilon' coffee. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.9, p.1171-1176, 2008.
- COVRE, A.M.; RODRIGUES, W.P.; VIEIRA, H.D.; BRAUN, H.; RAMALHO, J.C.; PARTELLI, F.L. Nutrient accumulation in bean and fruit from irrigated and non-irrigated *Coffea canephora* cv. Conilon. *Emirates Jornal Food Agriculture*, v.28, n.6, p.402-409, 2016.
- CONAB. Café Brasil: segundo levantamento de safra maio/2016: Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>>. Acesso em 02 de novembro de 2016.
- CUCOLOTTO, M.; PÍPOLO, V.C.; GARBUGLIO, D.D.; FONSECA JUNIOR, N. S.; DESTRO, D.; KAMIKOGA, M.K. Genotype x environment interaction in soybean: evaluation through three methodologies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.7, p.270-277, 2007.
- CRUZ, C.D., CARNEIRO, P.C.S.; REGAZZI, A.J. (2014). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed. Viçosa: Editora da UFV.
- DaMATTA, F.M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, B.C.; BUCKERIDGE, M.S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International*, v.43, p.1814-1823, 2010.
- FEHR, W.R. Principles of cultivars development. New York: Macmillan, 1987. 536p.
- FERNANDES, A.L.T.; PARTELLI, F.L.; BONOMO R.; GOLYNSKI, A. A moderna cafeicultura dos cerrados brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Tropical* v.42, n.2, p.231-240, 2012.

- FERRÃO, R.G.; CRUZ, C.D.; FERREIRA, A.; CECON, P.R.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.; CARNEIRO, P.C.S.; SILVA, M.F. Parâmetros genéticos em café Conilon. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.43, n.1, p.61-69, 2008.
- FONSECA, A.F.A.D; FERRÃO, R.G.; LANI, J.A.; FERRÃO, M.A.G.; VOLPI, P. S.; VERDIN FILHO, A.C.; RONCHI, C.P.; GUARÇONI, M.A. Manejo da cultura do café conilon: espaçamento, densidade de plantio e podas. In: FERRÃO et al. (Eds.). Café conilon. Vitória, ES: Incaper, 2007. p.257-277, Cap.9.
- IPCC. Intergovernmental panel on climate change. Working group III. Mitigation of Climate Change. 99.p. http://report.mitigation2014.org/drafts/final-draft-postplenary/ipcc_wg3_ar5_final-draft_postplenary_technical-summary.pdf. 2015.
- LEROY, T.; MONTAGNON, C.; CHARRIER, A.; ESKES, A.B. Reciprocal recurrent selection applied to *Coffea canephora* Pierre .2. Estimation of genetic-parameters. Euphytica, v.74, n.1-2, p.121-128, 1994.
- LONG, S.P.; ORT, D.R. More than taking the heat: crops and global change. Current Opinion in Plant Biology, n.3, v.13, p.241-248, 2010.
- MAIA, M.C.C.; RESENDE, M.D.V.; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V. Seleção simultânea para produção, adaptabilidade e estabilidade genotípicas em clones de cajueiro, via modelos mistos. Pesquisa Agropecuária Tropical, v.39, p.43-50, 2009.
- MARTINS, M.Q.; RODRIGUES, W.P.; FORTUNATO, A.S.; LEITÃO, A.E.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SILVA, M.J.; REBOREDO, F.H.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.I.; LIDON, F.J.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Protective Response Mechanisms to Heat Stress in Interaction with High [CO₂] Conditions in *Coffea* spp. Frontiers in Plant Science, v.7, p.947, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.00947
- PARTELLI, F.L.; BATISTA-SANTOS, P.; CAMPOS, P.S.; PAIS, I.P.; QUARTIN, V.L.; VIEIRA, H.D.; VIEIRA, H.D.; RAMALHO, J.C. Characterization of the main lipid components of chloroplast membranes and cold induced changes in *Coffea* spp. Environmental and Experimental Botany, v.74, p.194-204, 2011.
- PARTELLI, F.L.; MARRÉ, W.B.; FALQUETO, A.R.; VIEIRA, H.D.; CAVATTE, P. C. Seasonal vegetative growth in genotypes of *Coffea canephora*, as related to climatic factors. Journal of Agricultural Science, v.5, p.108-116, 2013.
- PICINI, A.G.; DE CAMARGO, M.B.P.; ORTOLANI, A.A.; FAZUOLI, L.C.; GALLO, P.B. Desenvolvimento e teste de modelos agrometeorológicos para a estimativa de produtividade do cafeeiro. Bragantia, v.58, n.1, p.157-170, 1999.
- PREZOTTI, L. C. et al. Calagem e adubação. In: FERRÃO, R. G. et al. (Ed.). Café conilon. Vitória: Incaper, 2007. p. 331-373.
- RAMALHO, A.R.; ROCHA, R.B.; SOUZA, F.F.; VENEZIANO, W.; TEIXEIRA, A. L. Progresso genético com a seleção de clones de conilon no Estado de Rondônia. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. Anais... Brasília: Embrapa Café, 2011. 1 CD-ROM.
- RAMALHO, A.R.; ROCHA, R.B.; SOUZA, F.F.; VENEZIANO, W.; TEIXEIRA, A. L. Progresso genético da produtividade de café beneficiado com a seleção de clones de cafeeiro 'Conilon'. Revista Ciência Agronômica, v.47, n.3, p.516-523, 2016.
- RENA, A.B.; MAESTRI, M. Ecofisiologia do cafeeiro. In: CASTRO, P.R.C. (Eds.). Ecofisiologia da produção agrícola. Piracicaba: POTAFOS, 1987. p.119-147.

- RESENDE, M.D.V. Genética Biométrica e Estatística no Melhoramento de Plantas Perenes. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 2002.
- RESENDE, M.D.V. (2007a). Selegen REML/BLUP: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos. Colombo: Embrapa Florestas.
- RESENDE, M.D.V. de; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v.37, n.3, p. 82-194, 2007b.
- ROCHA, R.B.; VIEIRA, A.H.; GAMA, M.DE M.B.; ROSSI, L.M.B. Genetic evaluation of bandarra (*Schizolobium amazonicum*) provenances by the REML/BLUP methodology. *Scientia Forestalis*, v. 37, n. 84, p. 351-358, 2009.
- ROCHA, R.B.; RAMALHO, A R.; TEIXEIRA, A.L.; SOUZA, F. DE F.; CRUZ, C. D. Adaptabilidade e estabilidade da produção de café beneficiado em *Coffea canephora*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.45, n.9, p.1531-1537, set, 2015.
- RODRIGUES, W.P.; VIEIRA, H.D.; BARBOSA, D.H.S.G.; SOUZA FILHO, G.R.; CANDIDO, L.S. Adaptability and genotypic stability of *Coffea arabica* genotypes based on REML/BLUP analysis in Rio de Janeiro State, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v.12, n.3, p.2391-2399, 2013.
- ROSADO, A.M.; ROSADO, T.B.; ALVES, A.A.; LAVIOLA, B.G. Seleção simultânea de clones de eucalipto de acordo com produtividade, estabilidade e adaptabilidade. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47, p.964-971, 2012.
- SILVA, G.O.; CARVALHO, A. D. F.; VEIRA, J.V.; BENIN, G. Verificação da adaptabilidade e estabilidade de populações de cenoura pelos métodos AMMI, GGE Biplot e REML/ BLUP. *Bragantia*, 70, 494-501, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052011005000003>.
- SILVA, S.C.; SANTANA, N.M.P.; PELEGRINI, J.C. Caracterização Climática do Estado de Goiás. In: FILHO, A.R.; CHIARELOTO, R.D.; MAGALHÃES, L.F.; RODRIGUES, A.P.; MOREIRA, M.L.O. Série Geologia e Mineração. Goiânia: CDU 551.58 (817.3), n.3, p.133, 2006. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABb7cAL/caracterizacao-climatica-estado-goias> Acesso em: 01 de outubro de 2015.
- SANTOS, A.D.; CECCON, G.; TEODORO, P.E.; CORREA, A.M.; ALVAREZ, R. DE C.F.; SILVA, J.F.DA.; ALVES, V.B. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de feijão caupi ereto via REML/BLUP e GGE Biplot. *Bragantia*, Campinas, v.75, n.3, p.299-306, 2016
- SILVEIRA, J.S.M.; CARVALHO, C.H.S.D.; (1993) BRAGANÇA, S. M.; FONSECA, A. F. A. da. A poda do café conilon. Vitória, ES: Emcapa, 14p. (Emcapa – Documento 80).
- SILVEIRA, J.S.M. Uma nova alternativa de manejo da poda do café conilon. *Revista Procampo*, Linhares, ES: 2008.

Conclusões Finais

Tendo em consideração o contexto das alterações climáticas futuras, onde é previsto o aumento de CO₂ atmosférico, aumento de temperatura e consequentemente o gradativo aquecimento global. Os resultados obtidos neste estudo mostram que existe resistência das plantas de *Coffea spp.*, quando cultivadas até a temperatura de 37°C, independente da condição de CO₂ (380 ppm ou 700 ppm). Essa resistência foi conseguida por meio da manutenção e do aumento do teor de moléculas protetoras, enzimas anti-oxidantes e pela expressão upregulada de genes envolvidas na fotossíntese e sistema de proteção da planta contra fatores estressivos. No entanto quando a plantas de *Coffea spp.* foram expostas a temperatura de 42°C, o estresse foi instalado, sendo observada a fotoinibição, principalmente em plantas cultivadas a 380 ppm de CO₂. Além disso, para o cafeeiro cultivado a 42°C foi observado uma regulação positiva na expressão de genes envolvidos na fotossíntese, sistema de proteção, além do aumento do teor de rafinose, onde em conjunto formaram uma linha de defesa para conseguir sobreviver a essa condição térmica.

Este estudo reforça a importância das informações mínimas para publicação das diretrizes de Experimentos Quantitativos em Tempo Real (MIQE) para normalizar os dados de qRT-PCR. Ressalta a importância da seleção adequada de genes de referência para cada condição ambiental a que se impõem plantas de *Coffea spp.* Além disso, este estudo constitui-se como a base para o estudo preciso das respostas moleculares de *Coffea spp.*, no contexto envolvendo os fatores climáticos temperatura e CO₂ atmosférico.

Foi verificado que diferentes genótipos de *C. canephora* cultivados em clima de altitude elevada, modificam seus padrões de acúmulo de nutrientes em acordo com a sazonalidade anual. A taxa de crescimento de ramos de *C. canephora* foi afetada negativamente com decréscimo da temperatura, principalmente quando a temperatura mínima registrada foi abaixo de 17°C. Esse resultado pode ser considerado importante, tendo em vista que é uma alternativa para contornar o impactos das elevadas temperatura sob a produção de café.

Entre os genótipos de *C. canephora* avaliados quando ao cultivo em clima de altitude elevada, destacaram-se seis materiais genéticos (3V), (NV2), (NV8), (P1), (VERDIM TA) e (A1), quanto à produtividade, adaptabilidade e estabilidade, quando avaliado pelo método de média harmônica da performance relativa dos valores genéticos. Analisando a diversidade existente entre os seis genótipos apontados como superiores, observa-se que para a característica taxa de crescimento de ramos ortotrópicos os genótipos NV8 e P1 são considerados semelhantes entre si, os genótipos A1 e NV2 são considerados semelhantes entre si, o genótipo 3V não é considerado semelhante aos cinco demais genótipos superiores e o genótipo de Verdim TA também não verifica-se como semelhante a nenhum outro genótipo de *C. canephora*. Para a característica taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos os genótipos Verdim TA e P1 são considerados semelhantes entre si, os genótipos A1 e NV2 são considerados semelhantes entre si, o genótipo 3V não é considerado semelhante aos cinco demais genótipos superiores e o genótipo de NV8 também não verifica-se como semelhante a nenhum outro genótipo. Para a característica teor de nutrientes em folhas de *C. canephora* verifica-se que os genótipos 3V, NV2, NV8 e A1 não são semelhantes entre si, e neste caso considerados divergentes, entretanto os genótipos P1 e Verdim TA verificam-se semelhantes entre si e neste caso são pouco divergentes.

Em conclusão pode-se notar que dentro de *Coffea spp.* existem recursos genéticos que podem ser utilizados para preservar a sobrevivência da cafeicultura quando submetida a condições adversas de temperaturas.