



NOVA

NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE
CIÊNCIAS DA TERRA

INTERAÇÃO DA SECA E DO CO₂ ELEVADO NAS RELAÇÕES HÍDRICAS E ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA - O CAFEIRO COMO CULTURA MODELO

JOSÉ MANUEL FERREIRA NOBRE SEMEDO

Mestre em Produção Agrícola Tropical

DOUTORAMENTO EM TECNOLOGIAS AGROINDUSTRIAIS

Universidade NOVA de Lisboa

Setembro, 2021



NOVA

NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE
CIÊNCIAS DA TERRA

INTERAÇÃO DA SECA E DO CO₂ ELEVADO NAS RELAÇÕES HÍDRICAS E ATIVIDADE FOTOSINTÉTICA - O CAFEIRO COMO CULTURA MODELO

JOSÉ MANUEL FERREIRA NOBRE SEMEDO
Mestre em Produção Agrícola Tropical

DOUTORAMENTO EM TECNOLOGIAS AGROINDUSTRIAIS

Universidade NOVA de Lisboa

Setembro, 2021

INTERAÇÃO DA SECA E DO CO₂ ELEVADO NAS RELAÇÕES HÍDRICAS E ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA – O CAFEIEIRO COMO CULTURA MODELO

JOSÉ MANUEL FERREIRA NOBRE SEMEDO

Mestre em Produção Agrícola Tropical

Orientador: Doutor José Domingos Cochicho Ramalho, Investigador Auxiliar com Habilitação, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Coorientadores: Doutora Paula Scotti Lorenzini Borges Campos, Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.
Professor Doutor Fernando José Cebola Lidon, Professor Catedrático, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Professor Doutor Virgílio António Cruz Machado, Diretor da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, por delegação de competências do Professor João Sàágua, Reitor da Universidade NOVA de Lisboa

Arguentes: Doutor Fábio Murillo DaMatta, Professor Titular da Universidade Federal de Viçosa, Brasil

Doutor Fábio Luíz Partelli, Professor Associado da Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, Brasil

Vogais: Doutor José Domingos Cochicho Ramalho, Investigador Auxiliar com Habilitação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Ana Isabel Ribeiro, Investigadora Auxiliar com Habilitação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor Benvindo Martins Maçãs, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Portugal

Doutor José António dos Santos Pereira de Matos, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Portugal

Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo, Professor Associado com Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

DOUTORAMENTO EM TECNOLOGIAS AGROINDUSTRIAIS

Universidade NOVA de Lisboa
Setembro, 2021

Interação da Seca e do CO₂ Elevado nas Relações Hídricas e Atividade Fotossintética - O Cafeeiro como Cultura Modelo

Copyright © José Manuel Ferreira Nobre Semedo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À Magda

Ao Francisco

Aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho, não teria sido possível sem a colaboração de várias pessoas e instituições a quem desta forma desejo expressar o meu agradecimento.

Sou definitivamente grato aos meus orientadores:

Doutor José Cochicho Ramalho, do Instituto Superior de Agronomia, da Universidade de Lisboa (ISA/UL), pela sua amizade e por me ter desafiado e encorajado a avançar de forma decisiva e segura para este projeto, sendo também responsável pela escolha da temática abordada e por muitos dos conselhos e ensinamentos adquiridos, bem como a introdução à maioria das metodologias utilizadas e à revisão aturada da tese.

Doutora Paula Scotti Campos, do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV), pelo seu empenho e pronta disponibilidade para me orientar, pela transmissão de diferentes conhecimentos metodológicos e científicos, assim como pela revisão criteriosa deste manuscrito, sendo também fundamental com a sua amizade para a manutenção do equilíbrio imprescindível ao longo do tempo.

Professor Doutor Fernando José Cebola Lidon, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade NOVA de Lisboa (FCT/UNL) por ter desempenhado desde o primeiro dia, o papel de promotor e fonte de incentivo para o arranque de todo este trabalho. Agradeço também toda a sua ajuda científica, metodológica e técnica bem como toda a estima demonstrada e o incondicional apoio enquanto coordenador do programa Doutoral no âmbito do qual esta dissertação é apresentada.

Quero agradecer à Mestre Isabel P. Pais (INIAV), por ter sido imprescindível na abordagem a diferentes metodologias. Os seus ensinamentos e apoio na realização de muitas tarefas bem com o seu companheirismo foram primordiais.

Sou grato ao Doutor José António Matos (INIAV) e ao Engenheiro António Eduardo Leitão (ISA/UL), elementos da comissão de acompanhamento de tese (CAT) pelas suas preciosas opiniões ao longo do progresso do plano de tese.

Agradeço ao Doutor Benvindo Martins Maçãs, Diretor da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologia e Recursos Genéticos, do INIAV, na qual me insiro, pelo incondicional apoio, que permitiu avançar com confiança para o trabalho proposto. A sua compreensão permitiu a partilha do tempo regular de trabalho no Instituto com a elaboração desta dissertação.

Agradeço ao INIAV, de forma particular à Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologia e Recursos Genéticos e toda a equipa do Laboratório de Fisiologia Vegetal em particular ao Engenheiro Mário Santos, Doutora Manuela Oliveira, aos Técnicos Paula

Vasilenko, Rita Moreira e Paulo Gaspar, pela sua ajuda e amizade, assim como pela utilização de espaços e equipamentos fundamentais para o bom desenvolvimento das metodologias de investigação.

Ao ISA/UL e à sua equipa de investigação do Laboratório de Relações Planta-Ambiente e Biodiversidade do Departamento de Recursos Naturais (pólos de Oeiras e Lisboa), pelos meios e condições proporcionadas para a realização deste trabalho.

Agradeço também à FCT/UNL, Departamento de Ciências da Terra (DCT), pela disponibilidade sempre demonstrada do seu corpo docente para o bom progresso do plano Doutoral.

Um agradecimento especial à Doutora Danielly Dubberstain (actualmente no Instituto Federal de Rondônia, Brasil), pelas longas horas de trabalho que partilhámos, numa verdadeira e enriquecedora colaboração em equipa e sentido de companheirismo.

Fico reconhecido à Doutora Ana Dias Rodrigues (ISA/UL), pelo empenho e amizade, pela confiança que sempre me transmitiu e pelo total apoio, tendo sido imprescindível a sua colaboração científica e técnica em muitas das metodologias utilizadas.

À ajuda da Doutora Maria José Silva (ISA/UL), na análise estatística e aprendizagem na utilização do programa estatístico utilizado.

À Doutora Maria Cristina Costa e Doutora Ana Moura (ISA/UL) por todo apoio e ensinamento nas metodologias para a avaliação das características estomáticas.

Aos colegas Doutor Casimiro Martins, Engenheiro Fernando Pereira Pires e Técnica Teresa Vales da Unidade de Investigação e Serviços de Sistemas Agrários e Florestais e Sanidade Vegetal, Laboratório de Ambiente e Recursos Naturais do INIAV pela caracterização do substrato (solo) utilizado nos ensaios.

Aos colegas, Weverton Rodrigues, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil (UENF), Madlles Martins e Lima Lima Deleon Martins (UFES) com quem tive o prazer de colaborar nos trabalhos em fisiologia do café sob condições de stresse térmico.

À minha colega da Escola Superior Agrária de Coimbra e do programa Doutoral Rosa Guilherme por me acompanhar desde o primeiro dia nesta empresa a que nos propusemos. Foi fonte de motivação e de apoio ao longo do tempo

À Doutora Maria do Céu Matos por me ter iniciado desde cedo para a investigação na área da Fisiologia Vegetal sendo em grande medida responsável pelo rumo da minha vida profissional e pessoal.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho que muitas vezes com um simples auxílio foram peças fundamentais.

Aos meus amigos próximos, pelo encorajamento constante e pelos bons momentos,

fundamentais para o equilíbrio emocional, promovendo a tranquilidade necessária.

Quero expressar em particular o meu reconhecimento a toda a minha família nomeadamente aos meus Pais por tudo o que representam para mim. Manifestar um afeto profundo e incondicional à Magda, minha mulher, pelo cuidado e carinho com que enfrentou desde o início toda esta empresa, nas alegrias das conquistas e nas adversidades próprias destes processos. Foi a fonte de coragem e compreensão. Ao meu filho Francisco, a minha maior ajuda e motivação sendo os seus abraços o maior conforto e fonte de perseverança.

Finalmente é devido um agradecimento às entidades financiadoras que suportaram os custos de investigação no âmbito das actividades de projectos, em concreto através de fundos da União Europeia, através do Programa Horizonte2020 de investigação e inovação (projeto BreedCAFS, n.º 727934), Edital H2020SFS-2016-2, Ação RIA, e de fundos nacionais da Fundação para a Ciência e Tecnologia, relativos ao projecto PTDC/ASP-AGR/31257/2017 e às Unidades de investigação Centro de Estudos Florestais, CEF (UIDB/00239/2020) e Unidade de Geobiociências, Geoengenharias e Geotecnologias, GeoBioTec (UIDP/04035/2020).



RESUMO

As alterações climáticas, associadas ao aumento da [CO₂] atmosférica (eCO₂) e a alterações nos padrões pluviométricos intra e interanuais, tornarão mais frequentes e severos os episódios de déficit hídrico sobre as culturas, incluindo a do café uma das mais importantes da região tropical. Pretendeu-se estudar os processos de aclimação do cafeeiro ao déficit hídrico, e compreender o potencial efeito mitigador do eCO₂ em plantas: 1) de dois genótipos das principais espécies produtoras, *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* L. cv. Icatu), 2) desenvolvidas em [CO₂] atmosférica ambiente (aCO₂, 380 µL L⁻¹) e elevada (eCO₂, 700 µL L⁻¹), 3) submetidas a conforto hídrico (WW), e défices hídrico moderado (MWD) e severo (SWD), 4) focando o processo fotossintético e mecanismos de defesa/aclimação. Em aCO₂, o MWD diminuiu a fotossíntese líquida (P_n), sem efeitos não-estomáticos em ambos os genótipos. SWD afetou significativamente a maquinaria fotossintética de CL153, mas não a de Icatu. Este mostrou tolerância, mantendo o funcionamento potencial (e.g., capacidade fotossintética, A_{max}; eficiência fotoquímica do fotossistema (PS) II, F_v/F_m; atividade da RuBisCO) e reforçando componentes fotossintéticos (e.g., proteínas ligadas aos PSs; transportadores tilacoidais de elétrons, como PQ-9 e Cit f), e outros ligados a mecanismos de defesa como pigmentos fotoprotetores (zeaxantina, Zea; luteína), enzimas antioxidativas (Cu,Zn-superoxido dismutase, SOD), moléculas de proteção (proteína de choque térmico, HSP70; componentes do transporte cíclico de elétrons, CEF), conjugado com alterações qualitativas e quantitativas dos ácidos gordos (AGs) das membranas cloroplastidiais. Em eCO₂ e WW, a P_n aumentou em ambos os genótipos, suportada pela redução da limitação à difusão de CO₂ e da fotorespiração, e pelo reforço de componentes foto- e bioquímicos (e.g., PSs, RuBisCO). A interação eCO₂ vs. MWD traduziu-se no menor impacto da seca na P_n e reforço de moléculas de proteção (e.g., Zea; ascorbato peroxidase, APX; ascorbato, Asc; HSP70) em ambos os genótipos. Em CL153 sob SWD, o eCO₂ promoveu aumentos moderados de carotenoides (significativo para neoxantina), enzimas antioxidativas, Asc, e dos principais AGs (C18:3 e C16:0), reverteu o impacto nos PSs e citocromos, resultando na redução da fotoinibição crónica e do índice de dano membranar. Já em Icatu, a eCO₂ reforçou componentes (e.g., citocromos; actividade dos PSs) e moléculas protectoras (SOD; APX; Asc; HSP70), mantendo aumentos já observados em aCO₂ (e.g., carotenoides; proteínas ligadas aos fotossistemas, CEF, AGs). Em síntese, o eCO₂ melhora a resposta do cafeeiro à seca, o que associado a uma eficiente gestão de rega poderá contribuir a futura sustentabilidade desta cultura.

Palavras-chave: aclimação, alterações climáticas, cafeeiro, CO₂ elevado, fotossíntese, seca



ABSTRACT

Climate change, associated with the atmospheric [CO₂] increase (eCO₂) and changes in intra- and inter-annual rainfall patterns, will boost the frequency and severity of water deficit episodes to crops, including coffee, one of the most important one in the tropical region. The aim was to study the acclimation processes of coffee to water deficit, and the unveil the potential mitigating effect of eCO₂ on plants: 1) of two genotypes from the main producing species, *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) and *C. arabica* L. cv. Icatu), 2) grown under ambient (aCO₂, 380 μL L⁻¹) and elevated (eCO₂, 700 μL L⁻¹) ai [CO₂], 3) subjected to well-water (WW), moderate (MWD) and severe (SWD) water deficits conditions, 4) focusing on the photosynthetic processes and the defence/acclimation mechanisms. Under aCO₂, MWD reduced net photosynthesis (P_n), without non-stomatal effects in both genotypes. SWD significantly affected the photosynthetic machinery of CL153, but not of Icatu. The latter showed tolerance, keeping the potential functioning (e.g., photosynthetic capacity, A_{max}; photosystem (PS) II photochemical efficiency, F_v/F_m; RuBisCO activity), and reinforcing photosynthetic components (e.g., PS associated proteins; thylakoid electron carriers, such as PQ-9 and Cit *f*), and others linked to defence mechanisms, such as photoprotective pigments (zeaxanthin, Zea; lutein), antioxidative enzymes (Cu,Zn-superoxide dismutase, SOD), protective molecules (heat shock protein, HSP70; components of cyclic electron transport; CEF), coupled with qualitative and quantitative changes in fatty acids (FAs) of chloroplast membranes. Under eCO₂ and WW, P_n raised in both genotypes, supported by reduced CO₂ diffusion limitation and photorespiration, and by enhanced photo- and biochemical components (e.g., PSs, RuBisCO). The eCO₂ and MWD interaction was shown by the lower drought impact on P_n and enhancement of protective molecules (e.g., Zea; ascorbate peroxidase, APX; ascorbate, Asc; HSP70) in both genotypes. In CL153 exposed to SWD, eCO₂ promoted moderate increases in carotenoids (significant for neoxanthin), antioxidative enzymes, Asc and the major FAs (C18:3 and C16:0), reverted the impact on PSs and cytochromes, ultimately reducing chronic photoinhibition and the membrane injury index. In Icatu, eCO₂ reinforced components (e.g., cytochromes; PSs activity) and protective molecules (SOD; APX; Asc; HSP70), while kept increases already found under aCO₂ (e.g., carotenoids; proteins associated to PSs, CEF; AGs). In summary, eCO₂ improves the coffee plant response to drought, which associated with efficient irrigation management may contribute to the future sustainability of this crop.

Keywords: acclimation, climate change, coffee tree, elevated CO₂, photosynthesis, drought



ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
RESUMO	3
1.1 O Contexto DAS ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS E A CULTURA DO CAFÉ	4
1.2 LIMITAÇÕES HÍDRICA E TÉRMICA	6
1.3 AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO ATMOSFÉRICA DE CO ₂	9
1.4 PERSPETIVAS FUTURAS PARA A CULTURA DO CAFÉ	11
1.5 OBJETIVOS	12
1.5.1 Objetivos do Trabalho	12
1.5.2 Formulação da Questão em Pesquisa	13
1.5.3 Estrutura do Trabalho	13
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
2. A RESILIÊNCIA INTRÍNSECA NÃO ESTOMÁTICA À SECA DO APARELHO FOTOSSINTÉTICO EM <i>Coffea</i> SPP. É REFORÇADA PELO AUMENTO DA [CO ₂] DO AR	21
RESUMO	23
2.1 INTRODUÇÃO	24
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.2.1 Material Vegetal e Condições de Crescimento	27
2.2.2 Imposição dos Níveis de Défice Hídrico	28
2.2.3 Potencial Hídrico Foliar de Pré Alvorada	29
2.2.4 Análise Foliar por Imagem Térmica Digital	29
2.2.5 Determinação de Trocas Gasosas Foliaves	30
2.2.5.1 <i>Fotossíntese Líquida e Controlo Estomático do Gasto de H₂O</i>	30
2.2.5.2 <i>Capacidade Fotossintética</i>	30
2.2.6 Avaliação de Parâmetros da Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	30
2.2.7 Quantificação do Ácido Abscísico Foliar	31
2.2.8 Detecção do Transporte Tilacoidal de Eletrões	31
2.2.9 Quantificação dos Transportadores Tilacoidais de Eletrões	31
2.2.10 Atividade de Enzimas Associadas à Via Fotossintética	32
2.2.11 Avaliação de Proteínas Associadas ao Aparelho Fotossintético	33
2.2.12 Delineamento Experimental e Análise Estatística	33
2.3 RESULTADOS	34
2.3.1 Estado Hídrico Foliar	34
2.3.2 Análise de Imagem Térmica	35

2.3.3 Trocas Gasosas Foliaves	36
2.3.4 Ácido Abscísico Foliar	38
2.3.5 Análise da Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	38
2.3.6 Taxas de Transporte Tilacoidal de Eletrões	41
2.3.7 Transportadores Tilacoidais de Eletrões	42
2.3.8 Enzimas da Fotossíntese	43
2.3.9 Proteínas do Aparelho Fotossintético	45
2.4 DISCUSSÃO	46
2.4.1 O Impacto da Seca no Desempenho Fotossintético e nos seus Componentes	47
2.4.2 O Impacto da Exposição Prolongada ao eCO ₂ no Funcionamento do Aparelho Fotossintético	51
2.4.3 Poderá o eCO ₂ Atenuar os Impactos da Seca a Nível Fotossintético em Café?	53
2.5 CONCLUSÕES	55
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
3. PAPEL DOS MECANISMOS DE PROTEÇÃO E DINÂMICA DA MATRIZ LIPÍDICA DAS MEMBRANAS DO CLOROPLASTO NA RESPOSTA AO DÉFICE HÍDRICO E À SUA INTERAÇÃO COM O AUMENTO DA [CO ₂] ATMOSFÉRICA	69
RESUMO	71
3.1 INTRODUÇÃO	72
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	75
3.2.1 Material Vegetal e Condições de Crescimento	75
3.2.2 Imposição dos Regimes Hídricos e Avaliação do Nível de Défice	75
3.2.3 Estado da Fotoinibição PSII	75
3.2.4 Determinação dos Pigmentos Fotossintéticos	76
3.2.5 Atividade Máxima de Enzimas Antioxidantes do Cloroplasto	76
3.2.5.1 <i>Cu,Zn- Superóxido Dismutase</i>	76
3.2.5.2 <i>Ascorbato Peroxidase</i>	77
3.2.5.3 <i>Glutathione Redutase</i>	77
3.2.6 Avaliação de Moléculas Protetoras não Enzimáticas	78
3.2.6.1 <i>Quantificação do Ascorbato</i>	78
3.2.6.2 <i>Quantificação da proteína de choque térmico 70 kDa</i>	78
3.2.7 Permeabilidade Membranar e Índice de Dano	78
3.2.8 Quantificação dos Lípidos Membranares do Cloroplasto	79

3.2.9 Delineamento Experimental e Análise Estatística	79
3.3 RESULTADOS	80
3.3.1 Estado de Fotoinibição do PSII	80
3.3.2 Pigmentos Fotossintéticos	81
3.3.3 Enzimas Antioxidativas do Cloroplasto	84
3.3.4 Moléculas Protetoras Não Enzimáticas	85
3.3.5 Impactos na Integridade Membranar	86
3.3.6 Análise da Matriz Lipídica das Membranas do Cloroplasto	87
3.4 DISCUSSÃO	89
3.4.1 Impacto do Défice Hídrico e do eCO ₂ no Funcionamento do PSII	89
3.4.2 Dinâmica dos Pigmentos Fotossintéticos	90
3.4.3 Outros Componentes Protetores	92
3.4.4 Integridade Membranar e Alterações Lipídicas do Cloroplasto	94
3.5 CONCLUSÕES	97
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS	113
5. APÊNDICES	119



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Potencial hídrico foliar de pré alvoreada (Ψ_{pa})	34
Figura 2.2. Índice de stresse hídrico (CWSI) (A) e do índice de condutância estomática (I_G) (B)	35
Figura 2.3. Parâmetros de trocas gasosas foliares: taxa de fotossíntese líquida (P_n) (A), condutância estomática para vapor de água (g_s) (B), concentração interna de CO_2 (C_i) (C) e capacidade fotossintética (A_{max}) (D)	37
Figura 2.4. Teor de ácido abscísico foliar (ABA)	38
Figura 2.5. Taxas de transporte de elétrons potencial do PSII, com (+OEC) (A) ou sem (-OEC) (B) participação do OEC, e do PSI (C)	41
Figura 2.6. Atividade inicial (A), atividade total (B), estado de ativação da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) (C) e atividade máxima ribulose-5-fosfato quinase (Ru5PK) (D)	44
Figura 3.1. Variação dos parâmetros da fluorescência relacionados com o cálculo do estado de fotoinibição, PI_{Chr} (fotoinibição crónica) (A), PI_{Dyn} (fotoinibição dinâmica) (B) e PI_{total} (fotoinibição total) (C)	80
Figura 3.2. Variação na atividade máxima das enzimas antioxidantes, Cu,Zn- superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD) (A), ascorbato peroxidase (APX) (B), glutatona redutase (GR) (C)	85
Figura 3.3. Variação nos teores de ascorbato (A) e HSP70 (B)	86
Figura 3.4. Variação no índice de dano membranar (I%)	87
Figura 3.5. Variação no teor dos ácidos gordos totais (AGT) (A) e do grau de insaturação (DBI) (B), dos lípidos membranares do cloroplasto	88



ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Parâmetros da fluorescência da clorofila <i>a</i> foliar	40
Tabela 2.2. Teores dos transportadores tilacoidais de elétrons, plastoquinona (<i>PQ-9</i>) e citocromos (<i>Cit</i>) <i>b</i> _{559LP} , <i>b</i> _{559HP} , <i>b</i> ₅₆₃ , e <i>f</i>	43
Tabela 2.3. Variação na quantidade relativa de proteínas do aparelho fotossintético, relacionadas com o PSI e II, OEC (relacionado com o PSII), LHCI e II, RuBisCO, RuBisCO ativase e associadas ao CEF dos PSs	46
Tabela 3.1. Variação dos teores dos pigmentos fotossintéticos: clorofila total (<i>a+b</i>), razão clorofila <i>a/b</i> e a razão clorofila total (<i>a+b</i>) / carotenóides totais, xantofilas e carotenos	83
Tabela 3.2. Variação das proporções (mole %) dos ácidos, palmítico (C16:0), hexadecenóico (C16:1 <i>c+t</i>), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), e linolénico (C18:3) de lípidos dos cloroplastos	89



SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ψ_{pa}	Potencial hídrico de pré alvorada
[CO ₂]	Concentração de CO ₂
ABA	Ácido abscísico
aCO ₂	Concentração de CO ₂ ambiente atmosférico
AGT	Ácidos gordos totais
A_{max}	Capacidade fotossintética
APX	Enzima ascorbato peroxidase
C16:0	Ácido palmítico
C16:1t	Ácido hexadecenoico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
CEF	Fluxo cíclico de eletrões
Chl	Clorofila
C_i	Concentração interna foliar de CO ₂
<i>Cit b_{559HP}</i>	Citocromo <i>b_{559HP}</i> (HP - alto potencial)
<i>Cit b_{559LP}</i>	Citocromo <i>b_{559LP}</i> (LP - baixo potencial)
<i>Cit b₅₆₃</i>	Citocromo <i>b₅₆₃</i>
<i>Cit f</i>	Citocromo <i>f</i>
<i>Cit</i>	Citocromo
Cu,Zn-SOD	Enzima Cu,Zn superóxido dismutase
CWSI	Índice de stresse hídrico da cultura/planta
DBI	Índice de insaturação
DEPS	Estado de desepoxidação
E	Taxa transpiratória
eCO ₂	Concentração elevada de CO ₂ atmosférico
F_o	Fluorescência basal
F_s/F_m'	Estimativa da taxa de inativação do PSII
F_v/F_m	Eficiência fotoquímica potencial/máxima do PSII
F_v'/F_m'	Eficiência fotoquímica do PSII à luz
GR	Enzima glutathiona redutase

g_s	Condutância estomática para o vapor de água
I%	Índice de dano membranar
I_G	Índice de condutância estomática
LHC I e II	Complexos de captação de energia luminosa associados ao PSI e PSII
MDA	Dialdeído malónico
MWD	Défice hídrico moderado
PF	Peso fresco
PGR5	Proteína reguladora do gradiente de protões
PI	Índice de fotoinibição
P_n	Taxa da fotossíntese líquida
PQ-9	Plastoquinona-9
PS	Peso seco
PSI e II	Fotossistemas I e II
PSII+OEC	Fotossistema II incluindo o complexo de evolução de oxigénio
PSII-OEC	Fotossistema II excluindo o complexo de evolução de oxigénio
q_L	Fator de amortecimento da fluorescência relacionado com o uso fotoquímico de energia, baseado no conceito de antenas interconectadas do PSII
q_N	Fator de amortecimento da fluorescência relacionado com o uso não-fotoquímico (dissipação) de energia
ROS	Espécies reativas de oxigénio
Ru5PK	Enzima ribulose-5-fosfato quinase
RuBisCO	Enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
SWD	Défice hídrico severo
WW	Conforto hídrico (plantas sem restrição hídrica)
$Y_{(II)}$	Estimativa do rendimento quântico fotossintético do transporte não cíclico de eletrões
$Y_{(NO)}$	Estimativa do rendimento quântico relacionado com dissipação não regulada de energia ao nível do PSII
$Y_{(NPQ)}$	Estimativa do rendimento quântico relacionado com dissipação regulada de energia ao nível do PSII

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL*

RESUMO

A variabilidade climática determina fortemente toda a produtividade agrícola, causando importantes impactos económicos e sociais. Num contexto de alterações climáticas globais, a manutenção e melhoria da produção agrícola apresenta-se nos próximos anos como um grande desafio para a investigação em plantas. O café, um dos mais importantes produtos agrícolas mundiais, é cultivado em mais de 80 países da região tropical. Diferentes estimativas para um futuro próximo, apontam para fortes reduções tanto do rendimento como das áreas adequadas à cultura do café, estando este facto relacionado com o previsto aumento da temperatura, bem como de alterações na quantidade e padrões intra e inter- anuais de distribuição da precipitação. No entanto, recentes resultados obtidos pela nossa equipa, mostraram que a planta do café pode ser mais resiliente do que é habitualmente aceite e que os impactos negativos provocados pelo aumento da temperatura a nível fisiológico e bioquímico, foram fortemente mitigados pelo aumento da [CO₂], um dos agentes promotores do aumento da temperatura do ar. Além disso, a identificação de indicadores ecofisiológicos e moleculares, particularmente os relacionados com a via de assimilação do C, que possam promover a aclimação das plantas ao aquecimento, poderão proporcionar a seleção de génotipos mais adaptados/tolerantes. Neste contexto, este capítulo 1 visa enquadrar as respostas fisiológicas e bioquímicas ao nível foliar em plantas de *Coffea* spp. sujeitas a temperaturas supra-óptimas e condições de escassez de água, assim com a interação destes com o aumento atmosférico de [CO₂], contribuindo deste modo para perceber a resiliência das plantas, e portanto a sustentabilidade desta cultura, em condições climáticas futuras.

Palavras-chave: agricultura, alterações climáticas, aquecimento global, aumento da [CO₂] atmosférico, cafeeiro, impactos ecofisiológicos, limitações hídricas

* Capítulo baseado na publicação: Semedo, J.N., Rodrigues, W.P., Martins, M.Q., Martins, L.D., Pais, I.P., Rodrigues, A.P., Leitão, A.E., Partelli, F.L., Campostrini, E., Tomaz, M.A., Reboredo, F.H., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.C., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2018) Coffee responses to drought, warming and high [CO₂] in a context of future climate change scenarios. In: Alves F., Leal W., Azeiteiro, U. (Ed.) Theory and Practice of Climate Adaptation, Chapter 26, *Climate Change Management Series*, Springer, Cham, Switzerland, pp 465-477.

1.1 O CONTEXTO DAS ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS E A CULTURA DO CAFÉ

A mudança climática global é um dos eventos mais importantes deste século. Impactos recentes devido a eventos climáticos extremos, como ondas de calor e frio, secas extremas ou eventos pluviométricos desproporcionais, expuseram ainda mais a grande vulnerabilidade dos sistemas agrícolas. Estima-se que num futuro próximo estas alterações sejam mais severas e frequentes, aumentando desta forma os riscos associados ao clima ou mesmo criando novas realidades (IPCC, 2013, Martins *et al.*, 2017). Vários são os fatores que contribuem para este cenário negativo, muito dos quais ainda pouco conhecidos na sua real dimensão. O aumento da concentração atmosférica de diferentes gases com efeito de estufa, com destaque para o dióxido de carbono (CO_2), originados principalmente pela atividade antropogénica, como o uso cada vez maior de combustíveis fósseis, o aumento global da população ou a alteração no uso do solo, tem contribuído para o aumento significativo da temperatura do ar (Buckeridge *et al.*, 2007, ECDRP, 2009, IPCC, 2014). A concentração de CO_2 do ar ($[\text{CO}_2]$) aumentou de ca. 280 para 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ desde o início do período pré-industrial até o presente. Dependendo muito do alcance das medidas para diminuir a sua emissão, a $[\text{CO}_2]$ poderá atingir valores entre 421 e 936 $\mu\text{L L}^{-1}$ até 2100, com aumentos paralelos estimados no aquecimento global de 0,3 a 1,7 °C (melhor cenário) ou 2,6 a 4,8 °C (pior caso cenário sem esforços adicionais para mitigar o aumento do CO_2), quando comparado aos valores observados para o período 1986-2005 (IPCC, 2013, 2014). Independentemente da causa/efeito do aumento da $[\text{CO}_2]$ no aquecimento é indiscutível que tanto a $[\text{CO}_2]$ quanto a temperatura, têm atingido novos máximos a cada ano. Este aumento da temperatura do ar terá um impacto generalizado, levando a mudanças drásticas na humidade do ar, contribuindo para modificar fortemente os regimes pluviométricos intra- e inter- anuais. Estas mudanças assentam em ciclos hidrológicos mais ativos, mudanças na circulação atmosférica e oceânica, bem como no aumento da capacidade de retenção de vapor de água pelo ar (Buckeridge *et al.*, 2007, CSIRO, 2016). Em conjunto estas realidades poderão levar a eventos de seca mais frequentes e extremos.

Porém, a mudança na $[\text{CO}_2]$ do ar terá igualmente uma ação direta nos processos fundamentais das plantas com potencial para alterar os rendimentos da produção agronómica e da qualidade dos produtos agrícolas (Drake *et al.*, 1997, Idso e Kimball, 1997, Luo *et al.*, 1999), com um papel positivo na produção, relacionada com o aumento significativo na assimilação líquida do carbono (Ainsworth e Rogers, 2007, Kirschbaum, 2011). Este impacto positivo será expectável se as plantas tiverem a capacidade para utilizar o aumento significativo de açúcares em condições de $[\text{CO}_2]$ elevada como foi observado em diversas plantas, como o pinheiro loblolly (LaDeau e Clark, 2001), laranja-

azedada (Idso e Kimball, 1997) e videira (Moutinho-Pereira *et al.*, 2009). Uma das consequências do aumento de [CO₂] atmosférico passa pela redução da taxa de fotorrespiração (com aumento da função de carboxilação e decréscimo da função de oxigenação da enzima RuBisCO), com o conseqüente incremento da taxa de fotossíntese líquida, o que poderá ter maior importância a temperaturas mais altas, podendo compensar o impacto negativo nas produções provocado por essas temperaturas supra-ótimas (Polley, 2002, DaMatta *et al.*, 2010).

O aumento da [CO₂] tem sido referido como tendo um efeito mitigador em relação ao impacto negativo das altas temperaturas nalgumas espécies de plantas, como o verificado com o aumento do crescimento de árvores, e conseqüentemente da produção florestal (Boisvenue e Running, 2006), ou no reforço do funcionamento e mecanismos de proteção em *Coffea* (Martins *et al.*, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016). O déficit hídrico, frequentemente associado ao aumento da temperatura e a alta irradiância, é um forte factor limitante para o crescimento, sobrevivência e produtividade a nível global, com impactos económicos significativos ao sector agrícola (Chaves *et al.*, 2003). Conceptualmente, pode-se definir seca agronómica como um longo período de precipitação deficiente, resultando em danos extensos nas culturas e perdas de rendimento à produção (NDMC, 2017). Dependendo da duração e intensidade do stresse, assim como do grau de tolerância da espécie/genótipo, a redução da disponibilidade hídrica prejudica um grande número de processos fisiológicos e metabólicos das plantas. Entre eles o metabolismo fotossintético é frequentemente afetado, primeiro devido ao fecho rápido dos estomas (mesmo em stresse hídrico muito leve), seguido de impactos não estomáticos em condições de stresse mais severas (Kaiser, 1987, Chaves *et al.*, 2003, Matos *et al.*, 2010, Ramalho *et al.*, 2014b). O crescimento e desenvolvimento de qualquer cultura dependem diretamente do metabolismo fotossintético. A diminuição da assimilação de carbono reduzirá a disponibilidade de açúcares (e por isso de energia) para manter o metabolismo celular e boas produtividades, estimando-se perdas de produção na ordem dos 50% para a maioria das principais culturas quando sujeitas a importantes estrangimentos de água (Wang *et al.*, 2003). Perspetivando os diferentes cenários das alterações climáticas, é provável que as condições de disponibilidade de água se agravem em vastas áreas mundiais (Ramalho *et al.*, 2014), em grande medida devido às alterações nos padrões intra- e inter anuais de precipitação.

O café é uma cultura tropical distribuindo-se desde a América Central e do Sul até África e ao Sudoeste Asiático, levada a cabo em mais de 80 países, sustentando cerca de 25 milhões de agricultores, maioritariamente pequenos proprietários (Waller *et al.*, 2007), constituindo a base económica de muitos desses países. O comércio mundial de café é

suportado fundamentalmente por duas espécies, *Coffea arabica* L. (café tipo Arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex. A. Froehner (café tipo Robusta), que em conjunto representam 99% da produção de café em grão (Partelli *et al.*, 2011, Davis *et al.*, 2012). Nos últimos anos a produção anual situou-se entre 8 e 9 milhões de toneladas de café em grão verde, gerando uma receita próxima de 173.000 milhões US\$ em toda cadeia de valor do café (ICO, 2014).

Vários estudos matemáticos usando modelos de previsão, tendo por base o aumento da temperatura e as características de *C. arabica*, estimam fortes impactos negativos na produção (Gay *et al.*, 2006, Craparo *et al.*, 2015), a extinção de populações selvagens (Davis *et al.*, 2012), a maior incidência de pragas e doenças (Magrath e Ghazoul, 2015), a redução até 50% das tradicionais áreas cultivadas com *C. arabica* já em 2050, com necessidade de deslocar a cultura para novas áreas (Bunn *et al.*, 2015a, Magrath e Ghazoul, 2015) geralmente de maior altitude e latitude (Ovalle-Rivera *et al.*, 2015).

Esta situação pode tomar proporções agravadas já que a maiorias das plantações hoje existentes têm vida útil produtiva entre os 20 a 50 anos e serão já expostas a estas novas condições ambientais (Bunn *et al.*, 2015b), embora dependendo da gestão e renovação das culturas. É, no entanto, importante salientar que os cenários previstos por estes modelos, baseiam-se fundamentalmente no aumento da temperatura atmosférica sem considerar o possível efeito de mitigador do aumento da [CO₂], bem como a resiliência natural da cultura do café a estas condições de stresse (Martins *et al.*, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016).

Tendo em conta o anteriormente descrito, torna-se imperativo estudar os principais mecanismos (com ênfase nos níveis fisiológico, bioquímico e molecular) envolvidos na aclimação/adaptação de diferentes genótipos de café, permitindo-lhes resistir aos impactos causados por um ambiente em constante mudança. O conhecimento, nomeadamente o proveniente de vários indicadores ecofisiológicos para diferentes genótipos e sua interação com o meio ambiente, ajudará na seleção de indivíduos mais tolerantes e servirá como ferramenta para selecionar/obter plantas melhoradas. Além disso, o uso simultâneo de variedades adaptadas e técnicas agronómicas adequadas, sobretudo tendo em atenção uma melhor eficiência do uso da água, pode contribuir para mitigar os impactos ambientais e preservar a produtividade agrícola (Dodd *et al.*, 2011).

1.2 LIMITAÇÕES HÍDRICA E TÉRMICA

A arquitetura hidráulica da folha do cafeeiro impõe constrangimentos à eficiência das trocas gasosas relativas à assimilação de carbono. Tal, deve-se à baixa condutância estomática, e

a limitações ao nível bioquímico e do mesófilo, embora não relacionadas com um funcionamento ineficiente de RuBisCO. Estas características estomáticas limitam o acesso do CO₂ aos locais de carboxilação favorecendo assim taxas de fotorrespiração relativamente mais elevadas, limitando ainda mais a assimilação de carbono (Martins *et al.*, 2014a, Ramalho *et al.*, 2014a). Adicionalmente, quando submetidas a déficit hídrico moderado, as plantas de alguns genótipos de café mostram um fecho rápido e eficiente dos estomas, o que limita o fluxo de transpiração, mas também o de CO₂, para o interior da folha, reduzindo a taxa de fotossíntese e conseqüentemente o crescimento e produtividade das plantas (Ronchi e DaMatta, 2007).

A alteração dos padrões sazonais de pluviosidade poderá afetar o crescimento e produtividade da cultura do café, particularmente se coincidir com as fases de plantação e de pré-antese, bem como durante o período de expansão e enchimento dos frutos. Na fase de plantação as plântulas apresentam uma área foliar reduzida, e uma zona radicular imatura, tornando-as mais suscetíveis ao déficit hídrico. A quebra de dormência dos botões florais da planta de café está diretamente relacionada com as primeiras chuvas e com um conforto hídrico do solo, sendo que uma baixa disponibilidade hídrica na fase de pré-antese pode induzir a produção de flores anómalas ou causar a sua abscisão. Para além disso, uma limitação hídrica na fase de expansão e enchimento dos frutos pode igualmente levar a perdas apreciáveis na produção, e diminuir a qualidade do grão de café (Crisosto *et al.*, 1992, Camargo e Camargo, 2001, Custódio *et al.*, 2014).

Uma baixa disponibilidade da água no solo leva também a reduções de turgidez celular, diminuindo o desenvolvimento foliar e promovendo a queda de folhas, com redução da área fotossinteticamente ativa e impacto direto no crescimento e produtividade das plantas (DaMatta e Ramalho, 2006). A título de exemplo, no Estado brasileiro do Espírito Santo uma seca severa que se prolongou por dois anos, associada a temperaturas do ar elevadas, provocou uma quebra média de produção de *Coffea canephora* de 15% em 2014 e de 48% em 2015. Contudo, devido ao forte impacto nas plantas, os efeitos prolongaram-se ainda no ano seguinte em muitas das áreas de cultivo, tendo inclusive, levado à redução da área total cultivada em ca. 18% em 2017 (CONAB, 2017). Ainda como consequência destes longos períodos de seca, muitos cafeeiros perderam parte da sua folhagem, expondo desta forma os frutos a uma maior quantidade de radiação solar, culminando numa redução do tempo de maturação e conseqüente perda de qualidade do grão. Outra consequência para a produção e qualidade do grão de café relacionada com fecho estomático e redução do fluxo de água na transpiração, tem a ver com restrições da absorção dos nutrientes minerais pelas raízes e a sua translocação para todos os órgãos da planta. Sabendo que os frutos

são um dos maiores drenos de nutrientes, particularmente de minerais, a limitação à sua absorção pelas raízes pode promover carências a nível da folha, podendo assim promover a senescência foliar, diminuindo o potencial de assimilação do carbono (Martinez *et al.*, 2014). Tal terá impactos negativos em ciclos de cultivo subsequentes, já que uma planta com menor área foliar terá uma capacidade produtiva diminuída.

Na maior parte das situações, o impacto da seca pode ser fortemente agravado por temperatura elevadas do ar. A seca e temperaturas desfavoráveis (sub- e supra-ótimas) são consideradas as principais limitações climáticas para o cultivo de café (DaMatta e Ramalho, 2006, Ramalho *et al.*, 2014a), embora possam existir variações intra- e inter-específicas em relação aos limites de tolerância. Em geral, nas plantas de café, a seca ou temperaturas extremas prejudicam a síntese de proteínas, lípidos e açúcares, o metabolismo enzimático e hormonal, em simultâneo com a forte redução do desempenho fotossintético. Podem ocorrer também impactos a nível membranar, nomeadamente nos componentes da matriz lipídica, com implicações nas reações ligadas à membrana, assim como na seletividade membranar e compartimentação celular. Estes são frequentemente refletidos numa perda de iões (eletrólitos) e à lipoperoxidação de ácidos gordos polinsaturados (Alonso *et al.*, 1997, Queiroz *et al.*, 1998, Campos *et al.*, 2003, Dias *et al.*, 2010, Scotti-Campos *et al.*, 2014). Adicionalmente, esta reação peroxidativa em cadeia pode promover a síntese de etileno, um regulador de crescimento responsável pela senescência foliar e floral (Finger *et al.*, 2006, Dias *et al.*, 2010).

O calor pode reduzir ainda mais o crescimento e desenvolvimento da planta do café devido a alterações fisiológicas/bioquímicas, nomeadamente devido à redução da capacidade fotossintética e ao aumento da taxa respiratória (DaMatta e Ramalho, 2006). Efetivamente a temperatura elevada pode induzir a perdas na assimilação de carbono, devido a um aumento proporcionalmente maior da respiração e da fotorrespiração relativamente à fotossíntese (DaMatta *et al.*, 2016). Para além disso, quando submetidas a altas temperaturas as plantas de café sofrem mudanças profundas nos processos de desenvolvimento, floração e frutificação. De facto, a exposição repetida a temperaturas superiores a 35 °C pode promover a produção de flores anormais, além de flores e frutos inviáveis, colocando em causa a produtividade e qualidade do grão (Camargo, 1985). Para além disso temperaturas supra-ótimas aceleram o desenvolvimento e maturação dos frutos com consequências negativas na qualidade final do grão e, portanto, na qualidade da bebida a obter (Camargo, 1985).

1.3 AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO ATMOSFÉRICA DE CO₂

O crescimento e a produção de biomassa vegetal estão intimamente ligados à taxa de absorção e assimilação de CO₂ através da via fotossintética. Neste sentido um incremento da concentração atmosférica de CO₂ ([CO₂]) pode aumentar a taxa de fotossíntese devido simultaneamente a uma maior taxa de carboxilação (maior disponibilidade do substrato), e menor taxa de fotorrespiração devido a uma inibição competitiva do CO₂ sobre o O₂ na enzima ribulose-1,5-carboxilase/oxigenase (RuBisCO) (Ramalho *et al.*, 2013b, Ghini *et al.*, 2015, Martins *et al.*, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016). Estes processos são frequentemente acompanhados por um aumento da eficiência do uso da água, devido à combinação da redução/manutenção da condutância estomática em conjunto com o já referido aumento da fotossíntese líquida (Ramalho *et al.*, 2013b, Rodrigues *et al.*, 2016).

Em muitas espécies de plantas, a taxa de fotossíntese líquida pode aumentar ca. 30-60% com [CO₂] do ar próximas a 600-700 µL L⁻¹ em comparação com as taxas obtidas com [CO₂] entre 370 e 390 µL L⁻¹ (Ainsworth e Rogers, 2007, Kirschbaum, 2011, Taiz e Zeiger, 2013), tal como observado igualmente em diferentes genótipos *C. arabica* e de *C. canephora* (Ramalho *et al.*, 2013b, Ghini *et al.*, 2015, DaMatta *et al.*, 2016). Para além disso, foi recentemente reportado que genótipos destas duas espécies podem manter o seu desempenho fotossintético quando expostos a temperaturas até 37 °C ao longo de todo o período diurno (Rodrigues *et al.*, 2016). Tal reflete uma tolerância a temperaturas bem acima do que seria de esperar, tendo em conta trabalhos clássicos que apontavam efeitos negativos na fotossíntese acima de 25 °C, mas estão em linha com as condições a que as plantas são frequentemente expostas nas áreas tropicais de cultivo de café (DaMatta e Ramalho, 2006).

Adicionalmente, os desempenhos fotoquímicos e bioquímicos do aparelho fotossintético aumentaram em condições de temperatura supra-ótima nas plantas desenvolvidas num ambiente com alta [CO₂] quando comparadas com as que se desenvolveram numa [CO₂] normal. Quando expostos a 42 °C os genótipos estudados foram significativamente afetados na maioria dos parâmetros fotossintéticos (particularmente a nível enzimático), sendo extensível às enzimas da via respiratória. Contudo, os impactos nos componentes fotossintéticos foram nalguns casos de certa forma atenuados nas plantas de [CO₂] elevada (700 µL L⁻¹) (Rodrigues *et al.*, 2016). Tal foi particularmente evidente ao nível do funcionamento dos fotossistemas que mostraram uma alta tolerância ao calor tanto a nível dos processos físicos (captura de energia) como dos processos fotoquímicos (transporte de eletrões). Em última instância, este melhor desempenho poderá contribuir

para reduzir a fotoinibição no aparelho fotossintético (Martins *et al.*, 2016). Este maior desempenho metabólico estará provavelmente relacionado com o reforço de mecanismos protetores e antioxidativos, como resposta a temperaturas supra-ótimas até 37 °C, e uma maior prevalência de alguns desses mecanismos a 42 °C nas plantas desenvolvidas a [CO₂] elevada (Martins *et al.*, 2016). Tal é da maior importância, já que o controlo efetivo do stresse oxidativo mostrou ser decisivo para a aclimação das plantas de café a diferentes stresses ambientais, como temperatura baixa, alta irradiação, seca ou carências em azoto (Ramalho *et al.*, 1998, Fortunato *et al.*, 2010, Batista-Santos *et al.*, 2011, Cavatte *et al.*, 2012, Ramalho *et al.*, 2014a). O controlo das condições oxidativas está associado, pelo menos parcialmente, a diferentes moléculas protetoras, tais como a proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70), α -tocoferol, neoxantina, luteína, carotenos e de oligosacarídeos da família da rafinose (RFOs), assim como a atividade mais elevada de diferentes enzimas antioxidantes, tais como a Cu,Zn-superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase e catalase. Tal foi adicionalmente associado a uma regulação positiva de genes relacionados com outras moléculas protetoras, como as proteínas precocemente induzidas pela luz (*ELIPs*) ou chaperoninas (*Chape 20 e 60*) (Martins *et al.*, 2016). Esta rede de respostas está de acordo com os mecanismos cruzados de resposta aos diferentes stresses abióticos, promovendo o controlo da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) quer a sua remoção (Wang *et al.*, 2004).

Outro aspeto importante, embora frequentemente negligenciado, está relacionado com a manutenção do equilíbrio mineral das plantas em condições de stresse. Em plantas de café em condições adequadas de temperatura, o aumento da [CO₂] atmosférica provocou apenas uma “diluição” mineral moderada nas folhas, com reduções de 7 a 25%, dependendo do mineral considerado e do genótipo de café em estudo (Martins *et al.*, 2014b). Sabe-se que o decréscimo do potencial fotossintético pode ser atribuído a uma redução dos teores de azoto (N) nos tecidos foliares, relacionada com uma menor alocação de N nos componentes da maquinaria fotossintética (Ainsworth e Rogers, 2007, Bader *et al.*, 2010). Contudo, as alterações verificadas nas plantas do café refletirão provavelmente alterações fisiológicas qualitativas em vez de falta de nutrientes (Thiec *et al.*, 1995), pois estas plantas foram capazes de manter funcionamento metabólico significativamente aumentado, sem sinais de existência de uma regulação negativa (*down-regulation*) ao nível da fotossíntese (Ramalho *et al.*, 2013b).

Adicionalmente, quando as plantas foram submetidas a temperaturas supra-ótimas observou-se um aumento dos níveis de quase todos os macro- e micro-nutrientes minerais, revertendo o efeito de “diluição” observado a 25 °C e [CO₂] elevado. Esta manutenção da

homeostase mineral poderá por outro lado desempenhar um papel positivo na termotolerância, devido ao importante papel de diferentes minerais no metabolismo celular. De facto, o desencadear de mecanismos antioxidativos em plantas de café está dependente da disponibilidade, nomeadamente de N (Ramalho *et al.*, 1998, 2000), e de Cu, Zn, Fe e Mn (Ramalho *et al.*, 2013a), com o Mn a ter um papel fundamental no funcionamento do fotossistema II (PSII). Neste sentido, a manutenção ou o aumento do desempenho do PSII, assim como da atividade de enzimas antioxidantes (Martins *et al.*, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016), estão de acordo com alterações observadas a nível dos minerais (Martins *et al.*, 2014b). Estes factos sugerem igualmente que o cafeeiro pode, dentro de certos limites, aclimatar-se ao aquecimento global no que respeita à sua dinâmica mineral foliar, apesar de uma atenção redobrada dever ser dada à gestão de fertilização de forma manter um balanço mineral equilibrado.

Em conjunto, os diferentes mecanismos referidos resultam numa maior capacidade da utilização da energia para processos fotoquímicos e na redução da fotorrespiração nas plantas em [CO₂] elevada a qualquer das temperaturas testadas, impedindo uma sobrecarga energética e diminuindo a probabilidade da formação de espécies moleculares altamente reativas de clorofila e O₂. O aumento do uso de energia na fotossíntese em condições de alta [CO₂] atmosférica pode ser considerado um meio primário de proteção, que em conjunto com o reforço dos mecanismos de proteção e a manutenção do balanço mineral das folhas possibilitou às plantas manter um melhor desempenho metabólico, mesmo em condições de temperaturas muito elevadas (42 °C) (Martins *et al.*, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016).

Em suma, o cafeeiro pode lidar de uma forma mais eficiente do que seria expectável ao aumento da temperatura e à seca, constituindo o aumento [CO₂] um facto determinante na termotolerância, o que é claramente relevante em termos de cenários climáticos futuros. Contudo, as limitações de água e temperatura elevada imporão dificuldades a esta cultura, sendo importante a tomada de ações rápidas e a adoção de uma estratégia integrada que mitigue os impactos das alterações climáticas previstas. Esta estratégia poderá incluir a obtenção de novos genótipos mais tolerantes, associado a técnicas agronómicas apropriadas que permitam atenuar os impactos negativos do calor e da seca, mantendo desta forma a quantidade e qualidade da produção de grão.

1.4 PERSPETIVAS FUTURAS PARA A CULTURA DO CAFÉ

Os cenários previstos relativos ao aquecimento global e ao aumento de défice hídrico, fazem antever sinais de alarme para a cultura do café (Bunn *et al.*, 2015a, Magrath e Ghazoul, 2015, Martins *et al.*, 2015). De facto, as projeções apontam para uma quebra de

ca. 50% na produção de café para o ano de 2050, levantando sérias interrogações relativas à sustentabilidade desta cultura em muitas das tradicionais áreas de cultivo. No entanto, estudos recentes mostram que o aumento da [CO₂] atmosférica pode atenuar de forma significativa os impactos negativos da temperatura excessiva, através do aumento do vigor vegetativo e dos mecanismos de defesa antioxidativos. Neste sentido é fulcral a realização de trabalhos multi-disciplinares e multi-institucionais para identificar e caracterizar os mecanismos de resposta das plantas aos constrangimentos que se preveem venham a ocorrer (frequentemente de forma simultânea), nomeadamente o aumento da [CO₂] atmosférica e a redução da disponibilidade hídrica decorrentes do aquecimento global. Desta forma será possível identificar características chave, que poderão ser utilizadas na seleção de plantas com melhor desempenho e contribuir para os programas de melhoramento. Estas medidas em conjunto com a implementação de medidas de mitigação, serão indispensáveis para uma gestão adequada das culturas nas novas condições ambientais, e para garantir da sustentabilidade futura da fileira do café.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivos do Trabalho

O trabalho apresentado vem no seguimento de vários projetos anteriores ao longo dos quais se foram estudando os efeitos de alguns fatores ambientais adversos. Pretende-se agora aprofundar o estudo dos impactos da seca e da sua interação com o aumento da [CO₂] atmosférica, utilizando os trabalhos já referidos na introdução (nomeadamente, DaMatta e Ramalho, 2006, Ramalho *et al.*, 2013; Martins *et al* 2014a; Rodrigues *et al.*, 2016) relativos à temática proposta, como referência e para comparação/discussão dos resultados e das conclusões a obter.

Pretendeu-se estudar a capacidade de aclimação de dois genótipos de *Coffea* spp. pertencentes às duas principais espécies produtoras de café a nível mundial: *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* L. cv. Icatu Vermelho. Para tal, pretendeu-se identificar e caracterizar os principais mecanismos de tolerância à seca, um fator ambiental que coloca em causa a sustentabilidade da fileira do café num contexto de previsíveis alterações climáticas para o presente século. Adicionalmente, considerando um ambiente crescentemente desfavorável à cultura, pretende-se avaliar se o previsto aumento da [CO₂] atmosférica, poderá eventualmente desempenhar um papel mitigador do impacto de menor disponibilidade hídrica. Propõe-se assim:

- Avaliar a capacidade de resposta das plantas ao déficit hídrico, e se o aumento da [CO₂] atmosférica poderá desempenhar um papel importante na resiliência da planta, com particular foco no metabolismo fotossintético;
- Avaliar o efeito das alterações ambientais no desencadear de diferentes mecanismos protetores (nomeadamente de pigmentos fotoprotectores e enzimas antioxidativas), na integridade membranar e composição lipídica do cloroplasto, de forma a identificar indicadores de danos celulares (sensibilidade) e de mecanismos de resposta (tolerância) ao stresse hídrico e ao stresse oxidativo, enquanto stresse secundário que frequentemente lhe está associado.

1.5.2 Formulação da Questão em Pesquisa

A questão científica que se coloca neste trabalho é a seguinte: num contexto de previsíveis alterações climáticas, com o aumento da frequência e intensidade do déficit hídrico, em simultâneo com o previsto aumento da [CO₂] atmosférica, terá o cafeeiro capacidade de aclimação/resiliência a esta nova realidade ambiental? E em caso da resposta ser positiva, quais os mecanismos que as plantas dispõem para lidar com essas novas (mais desfavoráveis) condições ambientais? Por fim, será que o aumento da [CO₂] atmosférica, frequentemente apontado como promotor do aquecimento global, pode desempenhar um papel (positivo, negativo, neutro) na resposta do cafeeiro à limitação hídrica, tal como já observado para temperaturas supra-ótimas?

1.5.3 Estrutura do Trabalho

O presente trabalho enquadra-se no âmbito do conhecimento dos aspetos ecofisiológicos e bioquímicos do cafeeiro, importante para a compreensão das relações da planta com o ambiente que a envolve, avaliando o sucesso ou insucesso adaptativo e as diferenças encontradas entre genótipos, estando dividido em quatro capítulos.

O primeiro Capítulo refere-se aos conceitos subjacentes ao trabalho, como são o conhecimento das características e limitações da planta e cultura do café. Os Capítulos 2 e 3 abordam a avaliação da potencial de aclimação/resiliência de duas cultivares (representando as duas principais espécies produtoras, *C. canephora* e *C. arabica*) às condições ambientais impostas de déficit hídrico e/ou elevada [CO₂] atmosférica. No Capítulo 2 é efetuada a caracterização dos dois genótipos em estudo, no que diz respeito ao

seu desempenho fotossintético em condições de seca e do impacto (positivo) que o aumento da [CO₂] atmosférica poderá ter na atenuação dos impactos negativos da seca ao nível do metabolismo fotossintético. Neste sentido, é analisada a ocorrência de alterações na eficiência de captação da luz e conversão em energia fotoquímica, nos componentes da maquinaria fotossintética e na capacidade de assimilação/fixação de CO₂. Por sua vez, de forma complementar, o Capítulo 3 incide fundamentalmente na análise do reforço de alguns mecanismos de resposta para proteção da maquinaria fotossintética e preservação da integridade membranar, com particular foco na interação entre os níveis de déficit hídrico e o aumento da [CO₂]. Por fim, o Capítulo 4 faz a integração e traça algumas ideias gerais com base nos capítulos anteriores.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth, E.A., Rogers, A. (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell & Environment*, 30:258-270.
- Alonso, A., Queiroz, C.S., Magalhães, A.C. (1997) Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica. Acta*, 1323:75-84.
- Bader, M.K.F., Siegwolf, R., Körner, C. (2010) Sustained enhancement of photosynthesis in mature deciduous forest trees after 8 years of free air CO₂ enrichment. *Planta*, 232:1115-1125.
- Batista-Santos, P., Lidon, F.C., Fortunato, A., Leitão, A.E., Lopes, E., Partelli, F., Ribeiro, A.I., Ramalho, J.C. (2011) The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. – Photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. *Journal of Plant Physiology*, 168:792-806.
- Boisvenue, C., Running, S.W. (2006) Impacts of climate change on natural forest productivity – evidence since the middle of the 20th century. *Global Change Biology*, 12:862-882.
- Buckeridge, M.S., Mortari, L.C., Machado, M.R. (2007) Respostas fisiológicas às mudanças climáticas: Alterações no balanço de carbono nas plantas podem afetar o ecossistema? In: *Fenologia-Ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos* (Editores Técnicos), Embrapa Floresta, pp 1-13.
- Bunn, C., Läderach, P., Pérez Jimenez, J.G., Montagnon, C., Schilling, T (2015b) Multiclass classification of agro-ecological zones for arabica coffee: An improved understanding of the impacts of climate change. *PLoS ONE*, 10(10):e0140490.

- Bunn, C., Läderach, P., Rivera, O.O., Kirschke, D.A. (2015a) Bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Climatic Change*, 129:89-101.
- Camargo, A. P. (1985) O clima e a cafeicultura no Brasil. *Informe Agropecuário*, 11:13-26.
- Camargo, A.P., Camargo, M.B.P. (2001) Definition and outline for the phenological phases of arabic coffee under Brazilian tropical conditions. *Bragantia*, 60:65-68.
- Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C., Nunes, M.A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*, 160:283-292.
- Cavatte, P.C., Oliveira, A.A. Morais, L.E., Martins, S.C., Sanglard, L.M. & DaMatta, F.M. (2012) Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. *Physiologia Plantarum*, 114:111-122.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30:239–264.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) (2017) Acompanhamento da safra brasileira de café 2017. Primeiro Levantamento, observatório agrícola. pp 1-99.
- Craparo, A.C.W., Van Asten, P.J.A., Läderach, P., Jassogne, L.T.P., Grab, S.W. (2015) *Coffea arabica* yields decline in Tanzania due to climate change: Global implications. *Agricultural and Forest Meteorology*, 207:1-10.
- Crisosto, C.H., Grantz, D.A., Meinzer, F.C. (1992) Effects of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). *Tree Physiology*, 10:127-139.
- CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation) (2016). State of the climate 2016. The biennial CSIRO and Bureau of Meteorology State of the Climate report. www.csiro.au (Accessed 17th February, 2017).
- Custódio, A.A.P., Lemos, L.B., Mingotte, F.L.C., Barbosa, J.C., Pollo, G.Z., Santos, H.M. (2014) Florescimento de cafeeiros sob manejos de irrigação faces de exposição solar e posições na planta. *Coffee Science*, 9:245-257.
- DaMatta, F.M., Godoy, A.G., Menezes-Silva, P.E., Martins, S.C.V., Sanglard, L.M, Morais, L.E., Torre-Neto, A., Ghini R. (2016) Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of Experimental Botany*, 67:341-352.
- DaMatta, F.M., Grandis, A., Arenque, B.C., Buckeridge, M.S. (2010) Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International*, 43:1814-1823.
- DaMatta, F.M., Ramalho, J.D.C. (2006) Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18:55-81.

- Davis, A.P., Gole, T.W., Baena, S., Moat, J. (2012) The impact of climate change on indigenous Arabica coffee (*Coffea arabica*): Predicting future trends and identifying priorities. PLoS ONE, 7:e47981.
- Dias, A.S., Barreiro, M.G., Campos, P.S., Ramalho, J.C., Lidon, F.C. (2010) Wheat cellular membrane thermotolerance under heat stress. Journal of Agronomy and Crop Science, 196:100-108.
- Dodd, I.C., Whalley, W.R., Ober, E.S., Parry, M.A.J. (2011) Genetic and management approaches to boost UK wheat yields by ameliorating water deficits. Journal of Experimental Botany, 62:5241-5248.
- Drake, B.G., González-Meler, M.A., Long, S.P. (1997) More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48:609-639.
- ECDPR (European Commission Directorate-General Regional Policy) (2009) The Climate change challenge for European regions – Regions 2020. Brussels.
- Finger, F.L., Santos, V.R., Barbosa, J.G., Barros, R.S. (2006) Influence of temperature on respiration, ethylene production and longevity of *Consolida ajacis* inflorescences. Bragantia, 65:363-368.
- Fortunato, A., Lidon, F.C., Batista-Santos, P., Leitão, A.E., Pais, I.P., Ribeiro, A.I., Ramalho, J.C. (2010) Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* spp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. Journal of Plant Physiology, 167:333-342.
- Gay, C., Estrada, F., Conde, C., Eakin, H., Villers, L. (2006) Potential impacts of climate change on agriculture: a case of study of coffee production in Veracruz, Mexico. Climatic Change, 79:259-288.
- 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. (2015) Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO₂ enrichment. Climatic Change, 132:307-320.
- ICO (2014) World coffee trade (1963–2013): A Review of the Markets, Challenges and Opportunities Facing the Sector. ICC (International Coffee Council), 111–115 Rev. 1, 29p. www.ico.org (Accessed July, 2016).
- Idso, S.B., Kimball, B.A. (1997) Effects of long-term atmospheric CO₂ enrichment on the growth and fruit production of sour orange trees. Global Change Biology, 3:89-96.
- IPCC-Intergovernmental Panel on Climate Change (2013) Climate Changes 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. In: Stocker T.F., Qin D., Plattner G.-K., Tignor M.M.B., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. (Ed.) Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA, p. 203.
- IPCC-Intergovernmental Panel on Climate Change (2014): mitigation of climate change. In: Edenhofer O., Pichs-Madruga R., Sokona Y., Farahani E., Kadner S., Seyboth K., Adler A., Baum I., Brunner S., Eickemeier P., Kriemann B., Savolainen J., Schlömer S., von Stechow C., Zwickel T., MinxContribution J.C. (Ed.) Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, Cambridge University Press, UK and New York, USA, p. 1435. ISBN 978-1-107-65481-5.
- Kaiser, W.M. (1987) Effect of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, 71:142-149.
- Kirschbaum, M.U.F. (2011) Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies. *Plant Physiology*. 155:117-124.
- LaDeau, S.L., Clark, J.S. (2001) Rising CO₂ levels and the fecundity of forest trees. *Science*, 292:95-98.
- Luo, Y., Reynolds, J., Wang, Y., Wolfe, D. (1999) A search for predictive understanding of plant responses to elevated [CO₂]. *Global Change Biology*, 5:143-156.
- Magrath, A., Ghazoul, J. (2015) Climate and pest-driven geographic shifts in global coffee production: Implications for forest cover, biodiversity and carbon storage. *PLoS ONE*, 10:e0133071.
- Martinez, H.E.P., Clemente, J.M., Lacerda, J.S., Neves, Y.P., Pedrosa, A.W. (2014) Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. *Revista Ceres*, 61:838-848.
- Martins, L.D., Eugenio, F.C., Rodrigues, W.N., Brinate, S.V.B., Colodetti, T.V., Amaral, J.F.T., Jesus Júnior, W.C., Ramalho, J.C., dos Santos, A.R., Tomaz, M.A. (2015) A bitter cup: the estimation of spatial distribution of carbon balance in *Coffea* spp. plantations reveals increased carbon footprint in tropical regions. *Plant Soil Environment*, 61:544-552.
- Martins L.D., Tomaz M.A., Lidon F.C., DaMatta F.M., Ramalho J.C. (2014a) Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. *Climatic Change*, 126:365-379.
- Martins, M.Q., Fortunato, A.F., Rodrigues, W.P., Partelli, F.L., Campostrini, E., Lidon, F.C., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C., Ribeiro-Barros, A.I. (2017) Selection and validation of reference genes for accurate RT-qPCR data normalization in *Coffea* spp. under a climate

- changes context of interacting elevated [CO₂] and temperature. *Frontiers in Plant Science*, 8:307.
- Martins, M.Q., Rodrigues, W.P., Fortunato, A.S., Leitao, 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. (2016) Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *Coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*, 7:947.
- Martins, S.V.C., Galmés, J., Cavatte, P.C., Pereira, L.F., Ventrella, M.C., DaMatta, F.M. (2014b) Understanding the low photosynthetic rates of sun and shade coffee leaves: Bridging the gap on the relative roles of hydraulic, diffusive and biochemical constraints to photosynthesis. *PLoS ONE*, 9:e95571.
- Matos, M.C., Campos, P.S., Passarinho, J.A., Semedo, J.N., Marques, N.M., Ramalho, J.C., Ricardo C.P. (2010) Drought effect on photosynthetic activity, osmolyte accumulation and membrane integrity of two *Cicer arietinum* genotypes. *Photosynthetica*, 48:303-312.
- Moutinho-Pereira, J., Gonçalves, B., Bacelar, E., Cunha, J.B., Coutinho, J., Correia, C.M. (2009) Effects of elevated CO₂ on grapevine (*Vitis vinifera* L.): Physiological and yield attributes. *Vitis*, 48:159-165.
- NDMC (The National Drought Mitigation Center) (2017) Drought Impact Reporter. www.drought.unl.edu. (Accessed 9th March, 2017).
- Ovalle-Rivera, O., Läderach, P., Bunn, C., Obersteiner, M., Schroth, G. (2015) Projected shifts in *Coffea arabica* suitability among major global producing regions due to climate change. *PLoS ONE*, 10:e0124155.
- Partelli, F.L., Batista-Santos, P., Scotti-Campos, P., Pais, I.P., Quantin, V.L., Vieira, H.D., Ramalho, J.C. (2011) Characterization of the main lipid components of chloroplast membranes and cold induced changes in *Coffea* spp. *Environmental and Experimental Botany*, 74:194-204.
- Polley, H.W. (2002) Implications of atmospheric and climate change for crop yield. *Crop Science*, 42:131-140.
- Queiroz C.G., Alonso A, Mares-Guia M., Magalhães A.C. (1998) Chilling induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biologia Plantarum*, 41:403-413.
- Ramalho, J.C., Campos, P.S., Teixeira, M., Nunes, M.A. (1998) Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Science*, 135:115-124.

- 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. (2014a) Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 26:5-18.
- Ramalho, J.C., Fortunato, A.S., Goulão, L.F., Lidon, F.C. (2013a) Cold-induced changes in mineral content in *Coffea* spp. leaves - Identification of descriptors for tolerance assessment. *Biologia Plantarum*, 57:495-506.
- Ramalho, J.C., Pons, T., Groeneveld, H., Azinheira, H.G., Nunes, M.A. (2000) Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: Role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Functional Plant Biology (ex- Australian Journal of Plant Physiology)*, 27:43-51.
- 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. (2013b) Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. *PloS ONE*, 8:e82712.
- Ramalho, J.C., Zlatev, Z.S., Leitão, A.E., Pais, I.P., Fortunato, A., Lidon, F.C. (2014b) Moderate water stress causes differential stomatal and non-stomatal changes on the photosynthetic functioning of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes. *Plant Biology*, 16:133-146.
- 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., Goulão, 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. (2016) Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *Coffea canephora* species. *Global Change Biology*, 22:415-431.
- Ronchi C.P., DaMatta F.M. (2007) Aspectos fisiológicos do café conilon. In: Ferrão R.G., Fonseca A.F.A., Bragança S.M., Ferrão M.A.G., De Muner L.H. (Ed.) *Café Conilon*, Incaper, Vitória, Brasil, pp. 95-115.
- Scotti-Campos, P., Semedo, J.N., Pais, I., Oliveira, M., Passarinho, J. & Ramalho, J.C. (2014) Heat tolerance of Portuguese old bread wheat varieties. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26:170-179.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2014) *Fisiologia Vegetal*. Artmed, Porto Alegre, Brasil. ISBN 85-363-0291-7.
- Thiec, D.L., Dixon, M., Loosveldt, P., Garrec, J.P. (1995) Seasonal and annual variations of phosphorus, calcium, potassium and manganese contents. In different cross-sections of *Picea abies* (L.) Karst. needles and *Quercus rubra* L. leaves exposed to elevated CO₂. *Trees*, 10:55-62.

- Waller, J.M., Bigger, M., Hillocks, R.J. (2007) Coffee pests, diseases and their management. In: Waller J.M., Bigger M., Hillocks R.J. (Ed.). World Coffee Production, 2, CAB International, Wallingford, UK ; Cambridge, MA, pp 17-40.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218:1-14.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9:244-252.

2. A RESILIÊNCIA INTRÍNSECA NÃO ESTOMÁTICA À SECA DO APARELHO FOTOSSINTÉTICO EM *Coffea* spp. É REFORÇADA PELO AUMENTO DA [CO₂] DO AR

2. A RESILIÊNCIA INTRÍNSECA NÃO ESTOMÁTICA À SECA DO APARELHO FOTOSSINTÉTICO EM *Coffea* spp. É REFORÇADA PELO AUMENTO DA [CO₂] DO AR*

RESUMO

As crescentes restrições hídricas associadas às alterações climáticas constituem um tremendo desafio para desempenho das culturas. Este trabalho apresenta os impactos verificados por um déficit hídrico moderado (MWD) ou severo (SWD), do aumento da [CO₂] atmosférica e suas interações, relativamente ao desempenho do aparelho fotossintético em plantas de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* L. cv. Icatu. Foram utilizadas plantas envasadas com sete anos, desenvolvidas sob [CO₂] de 380 (aCO₂) ou 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ (eCO₂) e gradualmente expostas a potenciais de pré alvorada entre -1,6 e -2,1 MPa (MWD), e inferiores a -3,5 MPa (SWD). Com seca, o fecho estomático foi acompanhado de perto pelo aumento dos valores de ácido abscísico (ABA). As trocas gasosas e os parâmetros da fluorescência foram progressivamente afetados em ambos os genótipos com o aumento da severidade de seca, com as limitações não estomáticas a tornaram-se gradualmente dominantes, particularmente nos componentes fotoquímicos e bioquímicos nas plantas CL153 em SWD. Em contraste, as plantas Icatu foram mais tolerantes ao SWD, com impactos praticamente inexistentes no funcionamento do potencial fotossintético e seus componentes (e.g., A_{max} , F_v/F_m , transportadores de elétrões, fotossistemas (PSs) e atividade da enzima ribulose-1,5-carboxilase/oxigenase (RuBisCO)). Ademais, as plantas Icatu em condições de seca e independentemente da [CO₂], apresentaram uma maior quantidade do conjunto de proteínas associadas ao aparelho fotossintético (PSs, complexo de armazenamento de luz, fluxo cíclico de elétrões, RuBisCO ativase). Em condições de conforto hídrico (WW), a eCO₂ não implicou uma regulação negativa da fotossíntese e controlo estomático para ambos os genótipos. Ao invés, o eCO₂ promoveu o desempenho fotossintético, reforçou moderadamente os componentes fotoquímicos (atividade dos PSs, transportadores de elétrões) e bioquímicos (RuBisCO, ribulose-5-fosfato quinase), enquanto os mecanismos fotoprotetores e a presença de proteínas relacionadas com a maquinaria fotossintética se mantiveram maioritariamente inalterados. Nas plantas de ambos os genótipos submetidas a MWD, o

* Capítulo baseado na publicação: Smedo, J.N., Rodrigues, A.P., Lidon, F.C., Pais, I.P., Marques, I., Gouveia, D., Armengaud, J., Smedo, M.C., Martins, S., Simões, M.C., Moura, I., Dubberstein, D., Partelli, F.L., Silva, M.J., Reboredo, F.H., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2021). Intrinsic non-stomatal resilience to drought of photosynthetic apparatus in *Coffea* spp. can be strengthened by elevated air CO₂. *Tree Physiology*, 41(5): 708–727.

eCO₂ retardou a severidade do déficit hídrico, promovendo o desempenho fotossintético com menor dissipação de energia e impactos no PSII, sendo o fecho estomático dissociado do aumento do ABA. Já nas plantas submetidas a SWD, o eCO₂ atenuou muitos dos impactos no desempenho fotossintético no genótipo CL153 (que havia sido moderadamente afetado pela seca em aCO₂). No entanto, a RuBisCO manteve-se como o componente mais sensível, devendo merecer uma atenção especial por parte dos programas de melhoramento de forma a promover a sustentabilidade da cultura do café num cenário de futuras alterações climáticas.

Palavras-chave: aclimação, alterações climáticas, assimilação de carbono, aumento da [CO₂] atmosférica, cafeeiro, mitigação do déficit hídrico.

2.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento atual sobre o clima global aponta para importantes mudanças, fundamentalmente associadas ao aumento da temperatura do ar e à alteração dos padrões pluviométricos. Neste contexto, espera-se um agravamento de períodos de seca prolongados intercalados com eventos de precipitação extrema particularmente subtropicais e tropicais (IPCC, 2014, 2018). Prevê-se que estas alterações sejam acompanhadas por um aumento contínuo da [CO₂] atmosférico. Dependendo dos próximos cenários de âmbito antropogénico para a emissão de gases com efeito de estufa, a [CO₂] poderá atingir os 936 µL CO₂ L⁻¹ até 2100 acompanhado de um aquecimento global entre os 2,6 e 4,8 °C relativamente ao período 1986/2005 (IPCC, 2013, 2014).

A seca representa o maior estrangulamento para a produção agrícola sendo responsável pela limitação de um conjunto de processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos com impacto no desenvolvimento, na absorção de nutrientes, na assimilação de C e na partição de fotoassimilados (Chaves *et al.*, 2009, Fahad *et al.*, 2017, Lamaoui *et al.*, 2018, Lang *et al.*, 2018). Contudo, as plantas têm a capacidade de estabelecer diferentes estratégias que lhes permitam resistir a períodos de seca, que envolvem ajustamentos desde o gene até à planta completa (Chaves *et al.*, 2003, Xiong *et al.*, 2006, Hummel *et al.*, 2010). Desta forma é crucial compreender os diferentes mecanismos de aclimação para contribuir à seleção e melhoramento de cultivares mais tolerantes à seca (Chaves *et al.*, 2003, Hasan *et al.*, 2018).

Em seca moderada o fecho estomático é crucial para redução das perdas de água por transpiração (Matos *et al.*, 2002, Brodribb e McAdam, 2017), mas levando simultaneamente a restrições na difusão CO₂ na folha. Tal limitará a fotossíntese por via de um menor

fornecimento de CO₂ à enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO), mesmo em condições de seca moderada, onde usualmente se observam pequenas ou nenhuma alterações na eficiência dos fotossistemas (PSs) e na capacidade fotossintética (A_{max}) (Chaves *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2016, Zargar *et al.*, 2017).

Contudo, com o aumento da severidade da seca o desempenho fotossintético é afetado também por limitações nos processos fotoquímicos e bioquímicos, incluindo impactos nos teores de pigmentos, no desempenho dos PSs, da atividade enzimática (e.g. RuBisCO) e na integridade membranar (Chaves *et al.*, 2003, Muller *et al.*, 2011, Ramalho *et al.*, 2014, 2018b, Fahad *et al.*, 2017). Com a consequente redução do uso da energia fotoquímica impõem-se stresses secundários relacionados com a formação descontrolada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e clorofila o que poderá agravar os danos nos componentes do cloroplasto (Reddy *et al.*, 2004, Chaves *et al.*, 2009). Neste sentido, uma boa capacidade de lidar com a seca passa frequentemente pelo desencadear de dissipação térmica, de mecanismos fotoprotetores e antioxidantes, e no fluxo cíclico de elétrons (CEF) envolvendo os fotossistemas (PSs) (Miyake e Okamura, 2003, Chaves e Oliveira, 2004, Reddy *et al.*, 2004, Ramalho *et al.*, 2018b).

O aumento da [CO₂] afeta processos fundamentais nas plantas como a fotossíntese, o crescimento, rendimento e qualidade das culturas (Idso e Kimball, 1997, Bader *et al.*, 2010), alterando a partição da biomassa (Ainsworth *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2006). As taxas de fotossíntese líquida sofrem frequentemente aumentos de 30 a 60% com concentrações atmosféricas de 600 a 700 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ quando comparadas com as taxas obtidas entre 370 e 390 $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ (Ainsworth e Rogers, 2007, Kirschbaum, 2011). Este aumento resulta da maior disponibilidade de CO₂ para a função de carboxilação da RuBisCO, que paralelamente (por inibição competitiva) reduz a função oxigenase da mesma enzima, levando a uma redução concordante da taxa de fotorespiração e da produção de ROS (Ainsworth e Rogers, 2007, Leakey *et al.*, 2009). Este efeito “fertilizante” em carbono pode potenciar o rendimento das culturas (Long *et al.*, 2004, Norby *et al.*, 2005), embora este desempenho positivo possa ser atenuado em condições de seca, dependendo da sua severidade e duração (Tausz-Posch *et al.*, 2020).

O café é uma das produções agrícolas mais importantes no mercado mundial, sustentando aproximadamente 25 milhões de pequenos agricultores, envolvendo entre 100 a 125 milhões de pessoas em todo o mundo nesta importante cadeia de valor (Osorio, 2002, DaMatta *et al.*, 2019).

Diferentes estudos afirmam que nos encontramos efetivamente no centro de uma crise climática global, estimando-se que as futuras alterações climáticas irão restringir ainda mais

as culturas agrícolas em geral e a do café em particular, levando a fortes impactos a nível agrícola, social e económico, com significativas perdas de áreas de cultivo, maior incidência de pragas e doenças (Magrach e Ghazoul, 2015), a quebra generalizada de rendimentos (van der Vossen *et al.*, 2015), podendo ainda ocorrer a extinção de pelo menos 60% das espécies selvagens de cafeeiros (Davis *et al.*, 2019).

No entanto, trabalhos recentes demonstraram que o aumento da [CO₂] (eCO₂) pode promover a assimilação de Carbono (Ramalho *et al.*, 2013, Ghini *et al.*, 2015) e o maior investimento de carbono nas estruturas reprodutivas (Rakocevic *et al.*, 2020) levando desta forma a aumentos na produtividade, sempre que verificadas as condições de hidratação adequadas (DaMatta *et al.*, 2019). De facto, sem restrição de água está demonstrado que o eCO₂ fortaleceu o desempenho fisiológico das plantas de café (Ramalho *et al.*, 2013). Além disso, o eCO₂ aumentou a resiliência da folha do café ao aumento do stresse térmico, assente no reforço do uso da energia fotoquímica, nos mecanismos de proteção (Martins *et al.*, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016), bem como uma maior dinâmica lipídica da membrana (Scotti-Campos *et al.*, 2019), preservando simultaneamente o equilíbrio mineral foliar (Martins *et al.*, 2014) e a qualidade do grão (Ramalho *et al.*, 2018a).

Estes resultados indicam um novo ângulo de abordagem, menos pessimista para a futura sustentabilidade da cultura do café, que tem por base as previsíveis alterações na temperatura (DaMatta *et al.*, 2019). Para além do fator temperatura verifica-se uma crescente preocupação com o cenário da escassez de água (DaMatta *et al.*, 2018, Ramalho *et al.*, 2018b), particularmente na zona tropical, onde se esperam fortes impactos com as mudanças do clima (IPCC, 2018). Prevê-se que o impacto da seca (e calor) seja agravado particularmente nas plantações de café em pleno Sol, o que implicará novos desafios da gestão, de forma a garantir a viabilidade da cultura do café (Dubberstein *et al.*, 2018, Semedo *et al.*, 2018).

Recentemente demonstrou-se que o eCO₂ atenua os impactos de uma seca moderada no desenvolvimento e desempenho fotossintético do café, melhorando o estado hídrico das plantas após a imposição da seca (Avila *et al.*, 2020a, 2020b). No presente trabalho pretendeu-se compreender quais os mecanismos subjacentes pela qual o aparelho fotossintético tem a capacidade de se ajustar a uma crescente severidade de seca e como o eCO₂ poderá alterar estes mesmos ajustes. Nesse sentido, pôs-se a hipótese de que o eCO₂ melhorara a resiliência do funcionamento do aparelho fotossintético tanto a nível bioquímico como molecular em condições de seca, e que essa melhoria está dependente da da severidade do stresse hídrico. De forma a testar esta hipótese, avaliaram-se os impactos e as respostas das plantas através de determinações fisiológicas (análise térmica de

imagem foliar, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*), bioquímicas (transporte e transportadores tilacoidais de elétrons, atividade enzimática) e moleculares (quantificação de proteínas associadas aos PSs, RuBisCO e CEF). Para tal, utilizaram-se duas das principais espécies produtoras de café, desenvolvidas sob $[CO_2]$ atmosférico normal (aCO_2) e elevada de (eCO_2), e sujeitas respetivamente a défices hídricos moderados (MWD) e severos (SWD).

As conclusões obtidas fornecem provas importantes e oportunas sobre o papel mitigador do eCO_2 nos impactos nocivos do défice hídrico e indicam pontos relevantes da capacidade de tolerância/sensibilidade das plantas de café à seca, contribuindo assim para a melhor compreensão do desempenho desta cultura num cenário climático desfavorável.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Material Vegetal e Condições de Crescimento

Nestes estudos foram usadas plantas de dois génotipos de *Coffea* spp. das duas principais espécies produtoras cultivados no Brasil, *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* L. cv. Icatu Vermelho (uma cultivar proveniente do processo de introgressão, resultante do cruzamento de *Coffea canephora* e de *Coffea arabica* cv. Bourbon Vermelho sendo o híbrido resultante retrocruzado com *Coffea arabica* cv. Mundo Novo). As plantas com aproximadamente 7 anos, foram desenvolvidas em duas câmaras de crescimento tipo “walk-in” (EHHF 10000, ARALAB, Portugal) do Instituto Superior de Agronomia / Pólo de Oeiras. As plantas foram mantidas em condições ambientais controladas, de $25/20 \pm 1$ °C (dia/noite) de temperatura, $70 \pm 2\%$ de humidade relativa do ar, 12 h de fotoperíodo, ca. $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância máxima (PPFD) no terço superior das plantas, e com $[CO_2]$ do ar de $380 \pm 5 \mu\text{L L}^{-1}$ (aCO_2) ou $700 \pm 5 \mu\text{L L}^{-1}$ (eCO_2), simulando a última uma atmosfera que se estima venha a ter esse valor de CO_2 entre meados e o final do presente século (IPCC, 2018, DaMatta *et al.*, 2018). As plantas encontravam-se em vasos de 80 L, num substrato de terra, turfa e areia (3:1:3. v/v/v) podendo ser classificado como um solo, uma vez que se apresentou estável e não perturbado durante os últimos 3 anos de utilização. Este solo define-se como de textura areno-franca segundo a classificação de textura do solo de Gomes e Silva (1962) com um pH de 6,5. A caracterização do substrato foi realizada na Unidade de Investigação de Sistemas Agrários e Florestais e Sanidade Vegetal, Laboratório de Ambiente e Recursos Naturais do INIAV de acordo com Ramos *et al* (2013).

As plantas cresceram sem qualquer restrição nutritiva, fertilizadas com adubo

comercial 12-4-6 / N-P-K (ver Ramalho *et al.*, 2013), de espaço para desenvolvimento radicular ou hídrica (até à imposição programada dos diferentes regimes hídricos - ver ponto seguinte), mantendo-se o pleno conforto hídrico com regas a cada dois dias.

Neste trabalho foram utilizadas pseudorélicas já que o tratamento de CO₂ foi estabelecido para cada grupo de plantas (dentro da respetiva câmara) e não individualmente para cada planta (Hurlbert, 1984, 2004). No sentido de minimizar qualquer tipo de erro que possa ser associado a um “efeito câmara de crescimento”, o fabricante procedeu regularmente a uma calibração precisa das mesmas, de forma a garantir que as condições ambientais proporcionadas (humidade do ar, temperatura, intensidade e qualidade da luz) a todas as plantas fossem exatamente as mesmas para as duas câmaras utilizadas, com exceção das [CO₂] do ar, tendo sido também efetuada a troca frequente das plantas entre câmaras de forma a minimizar ao máximo os potenciais efeitos da utilização de pseudorélicas (Newman, *et al.*, 2011, Johnson *et al.*, 2016).

As determinações foram realizadas em folhas recém-adultas da parte superior (bem iluminada) do dossel, após pelo menos duas horas de eliminação. Sempre que possível, utilizou-se a mesma folha (ou folhas semelhantes da mesma planta) para as várias avaliações. Simultaneamente a cada ponto de determinações não destrutivas, efetuou-se a colheita de material vegetal para análises imediatas em laboratório ou para congelação instantânea em azoto líquido e armazenamento a -80 °C. Para análises laboratoriais as amostras foram previamente reduzidas a um pó fino em meio de azoto líquido (pós de azoto). Os homogenatos de material foliar foram obtidos em almofariz e soluções de homogeneização frias.

2.2.2 Imposição dos Níveis de Défice Hídrico

Para o estudo do impacto do défice hídrico (em aCO₂ e eCO₂) estabeleceram-se três níveis de disponibilidade hídrica, sendo respetivamente, conforto hídrico (controlo – WW, “*well watered*”), seca moderada (MWD, “*moderate water deficit*”) e seca severa (SWD, “*severe water deficit*”) com seis a nove plantas por tratamento e genótipo. As plantas WW foram mantidas em conforto hídrico apropriado ao longo de todo o ensaio com valores de potencial hídrico foliar no período de pré alvorada (Ψ_{pa}) acima de -0,35 MPa. A imposição dos dois regimes de défice hídrico foi efetuada ao longo de duas semanas pela suspensão gradual de rega, e reposição parcial em cada vaso, até à estabilização do Ψ_{pa} na gama pretendida, entre -1,5 e 2,5 MPa em MWD e valores abaixo de -3,5 MPa em SWD. As condições hídricas impostas representam ca. de 80% (WW), 25% (MWD) e 10% (SWD) da capacidade hídrica máxima do vaso (Ramalho *et al.*, 2018b). Após serem atingidos os níveis

pretendidos, as condições foram mantidas ao longo de mais duas semanas antes de se iniciarem as determinações *in vivo* e a recolha de amostras para posterior análise.

Deve sublinhar-se o facto de nas plantas do genótipo Icatu em eCO₂, o regime hídrico MWD só foi conseguido com a suspensão total de rega, nos últimos cinco dias após um período de quatro semanas, de modo a forçar a redução dos valores de Ψ_{pa} para os valores desejados já que estes persistiam em manter-se entre -0,6 e -0,8 MPa.

2.2.3 Potencial Hídrico Foliar de Pré Alvorada

O potencial hídrico foliar Ψ_{pa} foi medido numa folha adulta, utilizando para o efeito uma câmara de pressão (PMS Modelo 1000, Instrument Company, EUA) de acordo com o método de Schölander *et al.* (1965). O pecíolo foi cortado e a folha imediatamente submetida a uma pressurização crescente e gradual com azoto industrial. Em consequência, o suco xilémico aflorou à superfície do corte, altura em que se leu o valor da pressão que foi preciso aplicar à folha para repor a água na extremidade do pecíolo, a qual é igual ao valor do Ψ_{pa} , já que corresponde à pressão negativa a que a água no xilema estava sujeita antes do corte.

2.2.4 Análise Foliar por Imagem Térmica Digital

As imagens térmicas foliares foram obtidas com uma camara de imagens térmicas (GF300, FLIR Systems, Wilsonville, OR, EUA) e processadas pelo programa Therma Cam Explorer (FLIR Systems), de acordo com Grant *et al.* (2007). As imagens foram corrigidas através de calibração espacial, pela subtração de imagens de referência correspondentes a uma superfície isotérmica. Ao fotografar a copa das plantas, utilizaram-se folhas de referência de forma a simular a abertura e um fecho total dos estomas. Como referência para uma folha com os estomas totalmente fechados, a superfície da folha foi coberta com vaselina, para obter a temperatura da folha totalmente seca (T_{dry}).

Complementarmente, os valores de referência para uma folha com abertura total dos estomas, a superfície da folha foi aspergida com água, obtendo-se assim a temperatura da folha totalmente húmida (T_{wet}). As temperaturas de referência (T_{dry} e T_{wet}) em conjugação com a temperatura da folha no seu ambiente (T_{leaf}) são utilizadas para obter o índice da condutância estomática [$I_G = (T_{dry} - T_{leaf}) / (T_{leaf} - T_{wet})$], que é teoricamente proporcional à condutância estomática para o vapor de água, e o índice do stresse hídrico da cultura/planta [$CWSI = (T_{dry} - T_{leaf}) / (T_{dry} - T_{wet})$] (Grant *et al.*, 2007). Para o CSWI, os valores variam entre 0 e 1, em que os valores próximos de 0 indicam uma transpiração total da cultura/planta

(i.e., sem stresse hídrico) e os valores próximos de 1 indicam uma cultura/planta sem transpiração (i.e., em stresse hídrico máximo).

2.2.5 Determinação de Trocas Gasosas Foliaves

2.2.5.1 Fotossíntese Líquida e Controlo Estomático do Gasto de H₂O

As taxas da fotossíntese líquida aparente (P_n), condutância estomática (g_s) e [CO₂] interna (C_i) foram determinadas sob condições fotossintéticas num estado estacionário após ca. 2 h de iluminação a 25 °C, em folhas adultas e expandidas. Utilizou-se um analisador portátil de gases por infravermelho (IRGA) em circuito aberto (Li-Cor 6400, Li-Cor, Lincoln, NE, EUA) com uma câmara de 6 cm² com sistema integral de luz LED azul-vermelho, fornecimento externo [CO₂] de ca. 380 ou 700 µL L⁻¹ e uma irradiância de ca. 650 µmol m⁻² s⁻¹ sendo as taxas das trocas gasosas calculadas de acordo com as equações de von Caemmerer e Farquhar (1981). Este nível de irradiância está próximo da densidade máxima do fluxo fotossintético de fotões (PPFD) nas camaras de crescimento sendo suficientemente elevado para a P_n sob a [CO₂] utilizada neste estudo, como verificado em trabalhos preliminares.

2.2.5.2 Capacidade Fotossintética

A capacidade fotossintética máxima (A_{max}), que reflete a taxa fotossintética potencial em condições de luz e CO₂ saturante foi obtida pela observação da evolução do O₂ libertado, detetada por um eléctrodo de oxigénio do tipo Clark (LD2/2, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, Inglaterra), usando discos foliares (1,86 cm²), submetidos a uma temperatura estabilizada de 25 °C e condições saturantes de CO₂ (ca. 7% [CO₂], fornecido por 400 µL KHCO₃, 2 M) e irradiância (ca. 1200 µmol m⁻² s⁻¹, utilizando uma lâmpada Björkman (Hansatech) e filtros neutros) (Ramalho *et al.*, 2013).

2.2.6 Avaliação de Parâmetros da Fluorescência da Clorofila a

Os parâmetros da fluorescência da clorofila (Chl) *a* foram determinados, utilizando um sistema PAM 2000 (H. Walz, Effeltrich, Alemanha), nas mesmas folhas utilizadas nas medições das trocas gasosas conforme descrito por Rodrigues *et al.* 2016. As primeiras determinações foram realizadas em folhas perfeitamente adaptadas à escuridão, obtendo-se entre outros os níveis de fluorescência mínima ou basal (F_0) e da eficiência fotoquímica potencial do PSII (F_v/F_m). Um segundo conjunto de parâmetros foi determinado em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese, utilizando uma irradiância de 650 µmol m⁻²

s^{-1} de luz actínica e “flashes” saturantes (ca. $7500 \mu\text{mol m}^{-2} s^{-1}$), onde se incluem a eficiência fotoquímica do PSII em condições de iluminação (F_v'/F_m'), o factor de amortecimento (*quenched*) fotoquímico (q_L) baseado no conceito de antenas do PSII interconectadas (representando a proporção de energia capturada pelos centros do PSII (abertos) e dirigida para os processos fotoquímicos) e a estimativa da taxa de inativação do PSII (F_s/F_m'). Adicionalmente estimaram-se os rendimentos quânticos 1) do transporte não cíclico de eletrões ($Y_{(II)}$), 2) e de dissipação fotoprotetora de energia regulada de PSII ($Y_{(NPQ)}$) e 3) não regulada (calor e fluorescência) ($Y_{(NO)}$) onde [$Y_{(II)} + Y_{(NPQ)} + Y_{(NO)} = 1$].

2.2.7 Quantificação do Ácido Abscísico Foliar

O teor de ácido abscísico (ABA) foi quantificado como descrito por Rodrigues *et al.*, (2008), em amostras de folhas reduzidas a pó de azoto (ca. 100 mg de PF). A extracção foi realizada em 1,0 ml de 200 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 2% Triton X-100, 10% PVPP e 10% glicerol, após o que as amostras foram centrifugadas (5000 g, 5 min, 4 °C). O ABA foi então quantificado pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizando anticorpos monoclonais contra o ABA (Kit-Phyto Detek, Agdia, Elkhart, IN, EUA).

2.2.8 Deteção do Transporte Tilacoidal de Eletrões

Foram utilizados ca. 5 g de peso fresco de um conjunto de folhas provenientes de 6 plantas tendo-se procedido de imediato à maceração das amostras para a obtenção das frações membranares sub-cloroplásticas (Ramalho *et al.*, 1999). As taxas de transporte de eletrões (TTE) *in vivo* associadas ao fotossistema I (PSI) ($\text{DCPIP}H_2 \rightarrow \text{MV}$) e ao (PSII), incluindo ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$) ou excluindo ($\text{DPC} \rightarrow \text{DCPIP}$) o complexo da evolução de oxigénio (OEC), foram medidas com um eléctrodo de O_2 (LW2, Hansatech), utilizando 1 mL da mistura reacional contendo ca. 100 mg Chl, a 25 °C sob uma irradiância de ca. $3000 \mu\text{mol m}^{-2} s^{-1}$ fornecida por uma lâmpada Björkman (Hansatech).

2.2.9 Quantificação dos Transportadores Tilacoidais de Eletrões

Utilizou-se um conjunto de folhas provenientes de 6 plantas para a obtenção das frações membranares sub-cloroplásticas para a determinação da plastoquinona-9 (PQ-9), (ca. 5 g de PF) e dos citocromos (Cyt), (ca. 7 g de PF). As determinações espectrofotométricas foram obtidas conforme descrito anteriormente por Dubberstein *et al.* 2020. Resumidamente, o teor de PQ-9 foi determinado pela diferença de absorção entre as formas oxidada e reduzida de PQ-9 a 255 nm, em relação aos comprimentos de onda *isosbest* de 276 e 308

nm, assumindo-se um coeficiente de absorvidade de $14,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O teor do citocromo b_{559LP} , b_{559HP} , b_{563} e f foram obtidos a 545 nm utilizando comprimentos de onda *isobest* de 528 e 568 nm para o citocromo b_{559} e 552 e 572 nm para o citocromo b_{563} . Assumiu-se um coeficiente de extinção de $20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Para o Cyt f os valores foram obtidos a 554 nm, assumindo um coeficiente de extinção de $19,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.10 Atividade de Enzimas Associadas à Via Fotossintética

Utilizaram-se amostras de folhas reduzidas a pó de azoto (ca. 100 mg de PF), para a determinação da atividade das enzimas ribulose-1,5-carboxilase/oxigenase (RuBisCO, EC 4.1.1.39) e ribulose-5-fosfato quinase (Ru5PK, EC 2.7.1.19), através dos métodos propostos por Tazoe *et al.*, (2008) e Souza *et al.*, (2005), respetivamente, otimizados para as folhas de cafeeiro (Ramalho *et al.*, 2003).

O homogeneizado foi realizado em 1 mL de tampão de extração 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), contendo 10 mM MgCl_2 , 15 mM NaHCO_3 , 10 mM β -mercaptoetanol, 2 mM DTT, 1% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) glicerol e 2% (v/v) "Complete protease inhibitor cocktail" (Roche, ref. 04693159001) em conjunto com 100 mg de PVPP insolúvel por homogenato. Os extratos foram centrifugados (16000 g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante limpo obtido foi utilizado para a determinação espectrofotométrica das atividades da RuBisCO e da Ru5PK. Para a avaliação da atividade da RuBisCO utilizou-se um meio contendo um tampão com 50 mM Tris-HCl, (pH 8,0), 15 mM MgCl_2 , 20 mM NaHCO_3 , 100 mM fosfocreatina, 10 mM ATP, 0,2 mM NAPH, 20 U mL^{-1} creatina fosfoquinase (CPK), 15 U mL^{-1} ácido 3-fosfoglicérico fosfoquinase (PGAK) e 15 U mL^{-1} gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH).

Para a determinação da atividade inicial da RuBisCO adicionou-se 15 μL de 667 mM RuBP (10 mM como concentração final) a 20 μL do sobrenadante limpo (amostra) seguido da leitura imediata. A atividade total da RuBisCO foi obtida adicionando-se 20 μL do sobrenadante limpo, seguido de um período de incubação de 20 minutos a 25°C de forma a garantir a completa ativação da enzima. A reação foi então iniciada com a adição 10 mM RuBP (como concentração final). Em ambos os casos, as medições seguiram-se à oxidação do NADH dependente do 3-PGA, a 340 nm.

Para determinar a atividade da Ru5PK foram adicionados 20 μL do sobrenadante à célula de espectrofotómetro em conjunto com tampão 100 mM Tris-HCl contendo 8 mM MgCl_2 , 40 mM KCl, 20 mM fosfoenolpiruvato, 5 mM ATP, 1mM NADH, 20 mM DTT, 8 U piruvato quinase, 10 U mL^{-1} lactato desidrogenase e 5 U mL^{-1} fosforiboisomerase. Ao fim de um período de 15 min de incubação, a reação foi iniciada com a adição de 10 μL de 500 mM ribose-5-fosfato, seguindo-se espectrofotometricamente a oxidação do NADH a 340 nm. A

determinação espectrofotométrica da atividade destas duas enzimas foi realizada a 25 °C, num espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Japão) para um volume final de 1 mL.

2.2.11 Avaliação de Proteínas Associadas ao Aparelho Fotossintético

Todos os procedimentos realizados, incluindo a extracção de proteínas (de ca. 200 mg de folhas congeladas em pó de azoto), a análise por cromatografia líquida e por espectrometria de massa de alta resolução (nano LC-MS/MS), bem como a identificação e quantificação das proteínas, seguiram a metodologia previamente descrita por Dubberstein *et al.* (2020).

Os espectros obtidos por MS/MS foram associados às respetivas sequências dos peptídeos através do algoritmo de pesquisa MASCOT Daemon 2.6.1 (Matrix Science). Para inferência dos peptídeos e proteínas utilizou-se uma base de dados de referência para *C. canephora* (Denoeud *et al.*, 2014) de 25.574 sequências de polipeptídeos, num total de 10.251.572 resíduos, descarregado do Genóscopo no dia 1 de Julho de 2019 (http://coffee-genome.org/sites/coffee-genome.org/files/download/coffea_cds.fna.gz). Para este trabalho foram selecionadas 26 proteínas relacionadas com o aparelho fotossintético, de forma a associar os seus teores com os dados fisiológicos e bioquímicos obtidos, com o intuito de forma a melhorar a compreensão sobre as respostas das plantas de café às condições impostas de seca e/ou eCO₂. As proteínas selecionadas estão diretamente associadas com o PSI e o PSII, incluindo o OEC (relacionado com o PSII), os complexos de captação de energia luminosa (LHC I e II) associados aos PSs, o fluxo cíclico de eletrões (CEF) envolvido no PSI, bem como a RuBisCO e a RuBisCO activase.

A anotação proteica foi obtida através da base de dados UniProtKB (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=&sort=score>). Os dados originais de espectrometria de massa foram depositados no “ProteomeXchange Consortium” através do repositório dos parceiros PRIDE, com os identificadores PXD019830, projeto DOI: 10.6019/PXD019830 em *C. arabica* e PXD019831, projeto DOI: 10.6019/PXD019831 para *C. canephora*. Neste estudo foram ainda utilizados os identificadores de dados PXD019474 e PXD019541.

2.2.12 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Por cada genótipo, avaliou-se um conjunto de plantas submetidas de seis tratamentos, compondo um fatorial de 2 x 3 (duas [CO₂], aCO₂ ou eCO₂, e três níveis de disponibilidade hídrica, WW, MWD ou SWD), seguindo uma distribuição casualizada de seis a nove plantas por tratamento nas fitoclimas. Os vários parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram analisados estatisticamente através da metodologia ANOVA de três fatores de forma a

testar diferenças entre os genótipos (CL153 e Icatu), concentração de CO₂ (aCO₂ ou eCO₂), entre os tratamentos hídricos (WW, MWD ou SWD) e a sua interação (Tabelas suplementares S1 e S2).

Dado que o efeito genótipo apenas foi significativo em poucos casos (exceto na abundância das proteínas), e sendo o principal objetivo comparar o impacto da [CO₂] e dos regimes hídricos (e sua interação) de forma individual para cada genótipo, foi posteriormente efetuado um teste de Tukey (HSD) para comparação de médias (expresso nos gráficos e tabelas). A análise dos dados foi realizada utilizando o programa STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, Hamburgo, Alemanha).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Estado Hídrico Foliar

Os valores de Ψ_{pa} mostram uma transição progressiva em ambos os genótipos do estado de conforto hídrico (WW- ca. -0,30 MPa) para uma seca moderada (MWD- entre -1,6 e -2,1 MPa, exceto as plantas de Icatu-700) e para uma seca severa (SWD- com valores entre -3,7 e -4,5 MPa) (Fig. 2.1). É de salientar que as plantas em MWD exibiram valores mais altos de Ψ_{pa} com eCO₂ quando comparado aCO₂, sendo as diferenças significativas em Icatu. Estes valores mais elevados de Ψ_{pa} nas plantas Icatu em MWD (-0,6 MPa), foram igualmente mantidos na modalidade de seca severa (SWD), após a suspensão total de hidratação durante os cinco dias antes das determinações.

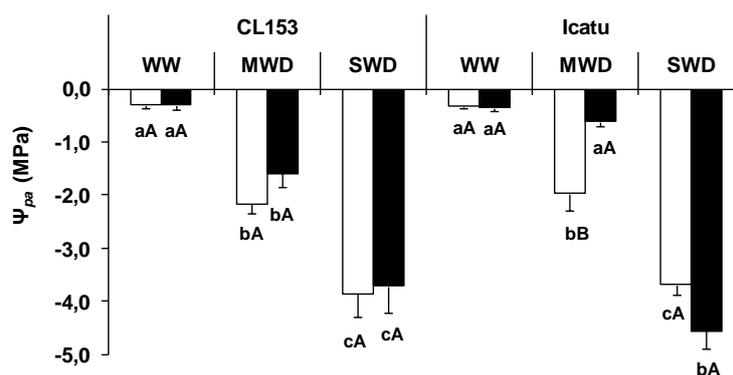


Figura 2.1. Potencial hídrico foliar de pré-alvorada (Ψ_{pa}) em plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO₂ ambiente (380 $\mu\text{L L}^{-1}$, barras brancas) ou CO₂ elevado (700 $\mu\text{L L}^{-1}$, barras pretas) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Para cada parâmetro o valor médio \pm SE (n = 5-6) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

2.3.2 Análise de Imagem Térmica

Pela variação gradual dos índices térmicos, tanto para o de stresse hídrico da cultura (CWSI) como o de condutância estomática (I_g) (Fig. 2.2 (B)) verificou-se que os regimes de seca impostos foram progressivamente atingidos até ao grau máximo de severidade nas plantas de SWD, de acordo com as variações de Ψ_{pa} verificados (Fig. 2.1). O estado de seca severa foi observado nas plantas de SWD, como comprovam os valores máximos de CWSI paralelamente com valores mais baixos de I_g , independentemente dos genótipos ou da $[CO_2]$. Embora não se tenham verificado diferenças notórias entre as duas $[CO_2]$ para os mesmos regimes hídricos, os índices observados nas plantas sob eCO₂ pouco se alteraram de WW para MWD (particularmente evidente em Icatu), em contraste com o verificado nas plantas em aCO₂ quando comparadas com o regime WW.

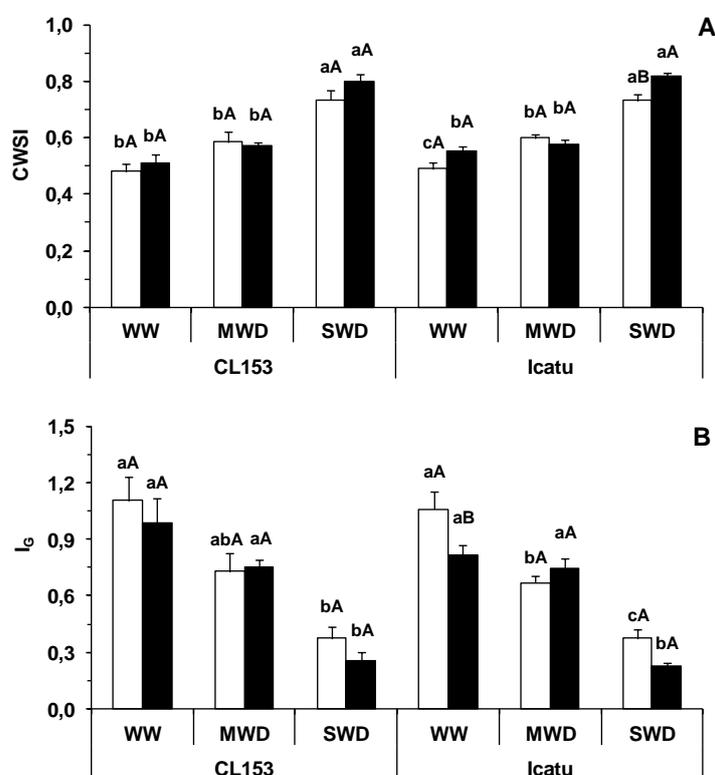


Figura 2.2. Índice de stresse hídrico (CWSI) (A) e do índice de condutância estomática (I_g) (B), calculados em folhas de plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO₂ ambiente (380 $\mu L L^{-1}$, barras brancas) ou CO₂ elevado (700 $\mu L L^{-1}$, barras pretas) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Para cada parâmetro o valor médio \pm SE (n = 5) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma $[CO_2]$ (a,b,c) ou entre as duas $[CO_2]$ no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

2.3.3 Trocas Gasosas Foliaves

Quando sujeitas a um déficit hídrico, as plantas na $[\text{CO}_2]$ de $380 \mu\text{L L}^{-1}$ sofreram decréscimos nas taxas da fotossíntese líquida (P_n) de 62 e 68% no regime hídrico MWD e de 84 e 92% em SWD, quando comparados com o regime WW para os dois genótipos respetivamente (CL153 e Icatu) (Fig. 2.3 (A)). Paralelamente, observaram-se reduções na condutância estomática (g_s) de 65 e 77% em MWD, e de 69 e 77% em SWD para a mesma sequência de genótipos. No regime SWD os valores da concentração interna de CO_2 (C_i) foram superiores (ca. dobro) nos dois genótipos, enquanto a capacidade fotossintética máxima (A_{max}) decresceu 32% em CL153 e 20% em Icatu, quando comparados com plantas em WW.

A exposição prolongada ao $e\text{CO}_2$ promoveu aumentos significativos dos valores de P_n de 37% (CL153) e 56% (Icatu) no regime hídrico de WW quando comparados com as plantas em $a\text{CO}_2$, sendo acompanhado com valores relevantes (mesmo que não significativos) de 35% e 16% de A_{max} .

O $e\text{CO}_2$ atenuou de forma evidente os decréscimos de P_n , g_s e A_{max} provocados por uma seca moderada (MWD), o mesmo não se tendo verificado para uma seca mais severa (SWD). De facto, no regime hídrico (MWD) e na $[\text{CO}_2]$ de $700 \mu\text{L L}^{-1}$ ambos os genótipos sofreram reduções de P_n mantendo, no entanto, os seus desempenhos muito próximos dos observados nas plantas em WW na $[\text{CO}_2]$ de $380 \mu\text{L L}^{-1}$, tendo-se verificado valores mais elevados de P_n (146% para CL153, e 240% para Icatu) quando comparados com as suas semelhantes a $380 \mu\text{L L}^{-1}$ no regime hídrico MWD. Este desempenho foi acompanhado por alterações não significativas de g_s e C_i quando comparados os regimes hídricos WW e MWD sob $e\text{CO}_2$. Os valores de A_{max} mostraram um padrão semelhante ao verificado pela P_n nas plantas em MWD com $e\text{CO}_2$ para ambos os genótipos, ou seja, embora se tenham observado ligeiras diminuições quando comparadas com os valores de WW a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ estas plantas ainda mantiveram, valores de A_{max} 50% (CL153) e 11% (Icatu) superiores quando comparados com seus homólogos na $[\text{CO}_2]$ de $380 \mu\text{L L}^{-1}$ no regime MWD.

A P_n e g_s foram fortemente reduzidas no regime SWD independentemente da $[\text{CO}_2]$ e do genótipo. Contudo, mesmo nestas condições de seca, foi preservado uma relevante capacidade de assimilação de carbono, com o A_{max} a mostrar ainda valores próximos dos 60% em CL153 e superior a 70% em Icatu em comparação com os obtidos nos respetivos controlos (WW).

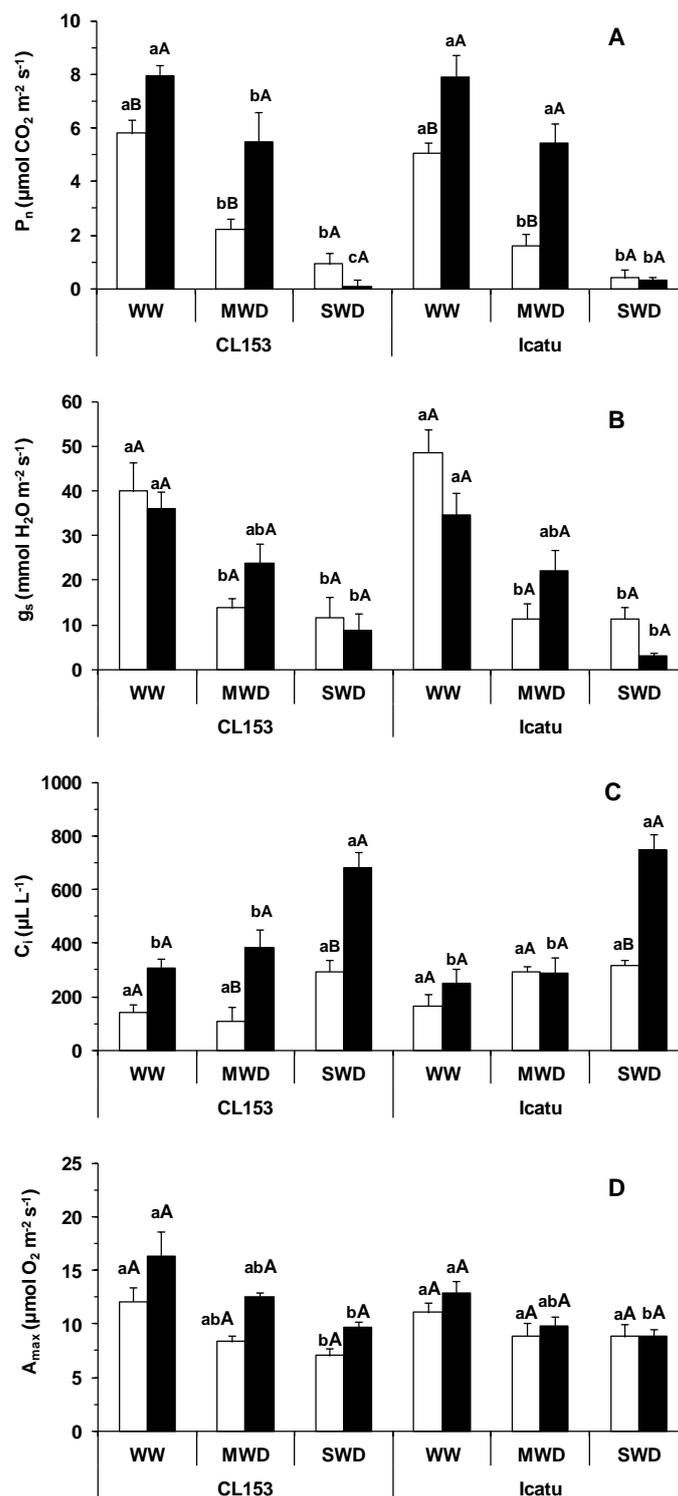


Figura 2.3. Parâmetros de trocas gasosas foliares: taxa de fotossíntese líquida (P_n) (A), condutância estomática para vapor de água (g_s) (B), concentração interna de CO₂ (C_i) (C) e capacidade fotossintética (A_{max}) (D) em plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO₂ ambiente (380 μL L⁻¹, barras brancas) ou CO₂ elevado (700 μL L⁻¹, barras pretas) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Para cada parâmetro o valor médio ± SE (n = 5-6) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

2.3.4 Ácido Abscísico Foliar

O efeito seca nas plantas sob aCO₂ provocou aumentos de ABA de ca. 46% no regime MWD em ambos os genótipos, e de 100% (CL153) e 184% (Icatu) no regime hídrico SWD, enquanto que com o eCO₂ no regime WW os valores de ABA aumentaram 85% unicamente em Icatu. (Fig. 2.4).

Com a restrição de água, o eCO₂ promoveu o aumento dos teores de ABA nos dois genótipos (com exceção de Icatu em SWD), tendo estimulado uma resposta mais precoce em Icatu que atingiu o valor máximo ainda no regime MWD mantendo-se assim posteriormente estável no regime SWD, enquanto nas plantas a 380 μL L⁻¹ o valor máximo de ABA foi observado em condições de SWD.

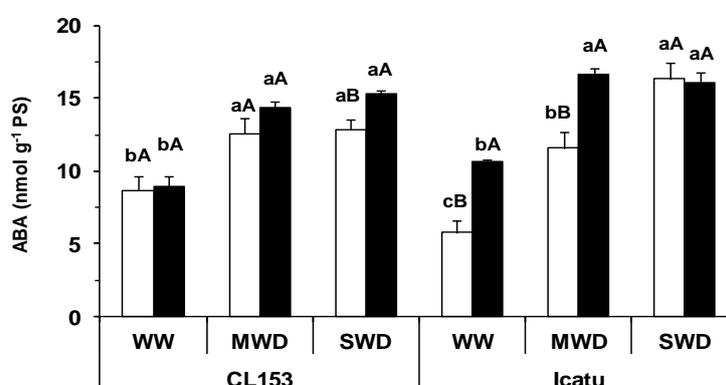


Figura 2.4. Teor de ácido abscísico foliar (ABA) em plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO₂ ambiente (380 μL L⁻¹, barras brancas) ou CO₂ elevado (700 μL L⁻¹, barras pretas) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Para cada parâmetro o valor médio ± SE (n = 4) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

2.3.5 Análise da Fluorescência da Clorofila a

Na [CO₂] a 380 μL L⁻¹ a imposição dos regimes de seca não afetou os valores de F_0 (mesmo em SWD) independentemente do genótipo. Em contraste, o eCO₂ nas plantas em WW, promoveu um aumento significativo de F_0 mantendo-se, no entanto inalterado nos regimes hídricos MWD e SWD (Tabela 2.1). Por sua vez, o eCO₂ em WW não afetou os valores de F_v/F_m para ambos os genótipos verificando-se apenas uma redução significativa de F_v/F_m em CL153 quando em SWD sob aCO₂, sendo este impacto amplamente atenuado com o eCO₂.

Em condições de equilíbrio dinâmico fotossintético, a eficiência fotoquímica do PSII (F_v'/F_m') manteve-se inalterada com o eCO₂ no regime WW, tendo-se, no entanto, verificado redução de F_v'/F_m' nas plantas em aCO₂ em MWD (Icatu - 30%) e SWD (CL153 - 40% e

Icatu 24%). O eCO₂ atenuou claramente os impactos da seca em F_v'/F_m' particularmente em Icatu onde não se verificaram reduções significativas tanto em MWD como em SWD, contrastando com o impacto observado no CL153 em SWD. Por sua vez, a estimativa da taxas de inativação do PSII (F_{v}/F_m') apresentou aumentos consideráveis nos dois regimes hídricos de seca para os dois genótipos com aCO₂, sendo estes impactos em grande parte atenuados com o aumento do CO₂ particularmente nas plantas do regime MWD.

A utilização da energia fotoquímica avaliada por $Y_{(II)}$ e q_L não foi afetada significativamente com o eCO₂ na modalidade WW, sendo, no entanto, observado um impacto acentuado nas modalidades de MWD e especialmente em SWD, com reduções de 82% e 62% da $Y_{(II)}$ e de 65% e 46% do q_L para os genótipos CL153 e Icatu respectivamente sob aCO₂. Contudo, o eCO₂ atenuou claramente os impactos de MWD e SWD sobre $Y_{(II)}$ e q_L nos dois genótipos, particularmente no regime MWD onde não se observaram impactos significativamente diferentes do verificados no regime de WW.

A capacidade da utilização fotoquímica da energia é em certa medida ponderada por mecanismos de dissipação da energia disponível em excesso. Os valores de $Y_{(NPQ)}$ mantivera-se inalterados com o eCO₂ no regime WW, mas aumentaram de forma significativa nos regimes de seca MWD e SWD, de uma forma semelhante nos dois genótipos com o CO₂ ambiente (aCO₂). Em SWD sob aCO₂, verificaram-se aumentos de 151% (CL153) e de 98% (Icatu) nos valores de $Y_{(NPQ)}$. De forma notável, esta eficiência na capacidade de dissipação de energia foi mantida a valores inferiores com eCO₂ tanto em MWD e SWD, quando comparados com os observados em aCO₂, o que está em concordância com a maior capacidade de utilização da energia fotoquímica em eCO₂.

Já os valores de $Y_{(NO)}$ sofreram apenas impactos marginais devido à seca, ao aumento da [CO₂], bem como a sua sobreposição, para ambos os genótipos, refletindo a ausência de um estado de agravamento no que se refere aos processos de dissipação não regulada.

Tabela 2.1. Parâmetros da fluorescência da clorofila *a* foliar, em plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO₂ ambiente (380 µL L⁻¹, aCO₂) ou CO₂ elevado (700 µL L⁻¹, eCO₂) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Os parâmetros incluem: fluorescência inicial (F_o), a eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m), coeficiente de amortecimento (*quenching*) fotoquímico (q_L), eficiência fotoquímica do PSII à luz (F_v'/F_m') e estimativa da taxa de inativação do PSII (F_s/F_m'), assim como as estimativas dos rendimentos quânticos do transporte não cíclico de elétrons [Y_(II)], da dissipação regulada de energia [Y_(NPQ)] e da dissipação não regulada de energia [Y_(NO)] do PSII. Para cada parâmetro o valor médio ± SE (n = 5) seguido por letras distintas representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

Genótipo	[CO ₂] (µL L ⁻¹)	Regime Hídrico	F _o	F _v /F _m	F _v '/F _m '	Y _(II)	Y _(NPQ)	Y _(NO)	q _L	F _s /F _m '
CL153	380	WW	0,210 ± 0,004aB	0,770 ± 0,008 aA	0,595 ± 0,023 aA	0,358 ± 0,044 aA	0,245 ± 0,043 bA	0,397 ± 0,015 aA	0,448 ± 0,066 aA	0,642 ± 0,044 bA
		MWD	0,224 ± 0,007aA	0,771 ± 0,010 aA	0,550 ± 0,015 aA	0,130 ± 0,034 bB	0,552 ± 0,032 aA	0,319 ± 0,024 aA	0,132 ± 0,038 bA	0,870 ± 0,034 aA
		SWD	0,233 ± 0,008aA	0,705 ± 0,025 bA	0,355 ± 0,037 bA	0,065 ± 0,010 bA	0,615 ± 0,021 aA	0,320 ± 0,026 aA	0,156 ± 0,030 bA	0,935 ± 0,010 aA
	700	WW	0,285 ± 0,014aA	0,774 ± 0,006 aA	0,642 ± 0,013 aA	0,396 ± 0,023 aA	0,303 ± 0,021 bA	0,301 ± 0,022 aB	0,375 ± 0,032 aA	0,604 ± 0,023 bA
		MWD	0,235 ± 0,007bA	0,777 ± 0,010 aA	0,649 ± 0,025 aA	0,354 ± 0,021 aA	0,272 ± 0,041 bB	0,373 ± 0,035 aA	0,304 ± 0,031 aA	0,646 ± 0,021 bB
		SWD	0,236 ± 0,009bA	0,747 ± 0,023 aA	0,423 ± 0,039 bA	0,153 ± 0,032 bA	0,564 ± 0,039 aA	0,283 ± 0,015 aA	0,247 ± 0,044 aA	0,847 ± 0,032 aA
Icatu	380	WW	0,251 ± 0,007aB	0,753 ± 0,005 aA	0,593 ± 0,022 aA	0,356 ± 0,029 aA	0,295 ± 0,034 bA	0,349 ± 0,018 aA	0,380 ± 0,029 aA	0,644 ± 0,029 bA
		MWD	0,247 ± 0,009aA	0,755 ± 0,011 aA	0,416 ± 0,026 bA	0,191 ± 0,032 bA	0,564 ± 0,039 aA	0,246 ± 0,020 aA	0,345 ± 0,063 abA	0,809 ± 0,032 aA
		SWD	0,244 ± 0,005aA	0,761 ± 0,008 aA	0,449 ± 0,020 bA	0,136 ± 0,013 bA	0,585 ± 0,026 aA	0,280 ± 0,024 aA	0,205 ± 0,028 bA	0,864 ± 0,013 aA
	700	WW	0,308 ± 0,011aA	0,734 ± 0,004 aA	0,588 ± 0,019 aA	0,351 ± 0,029 aA	0,314 ± 0,019 bA	0,335 ± 0,024 aA	0,385 ± 0,033 aA	0,649 ± 0,029 bA
		MWD	0,254 ± 0,007bA	0,744 ± 0,012 aA	0,529 ± 0,024 aA	0,265 ± 0,019 abA	0,361 ± 0,043 abB	0,374 ± 0,035 aA	0,320 ± 0,021 abA	0,735 ± 0,019 abA
		SWD	0,242 ± 0,005bA	0,757 ± 0,008 aA	0,521 ± 0,032 aA	0,199 ± 0,017 bA	0,486 ± 0,028 aA	0,315 ± 0,024 aA	0,236 ± 0,024 bA	0,801 ± 0,017 aA

2.3.6 Taxas de Transporte Tilacoidal de Eletrões

Analisaram-se as taxas de transporte de eletrões envolvidos nos dois fotossistemas, na perspetiva de tentar encontrar pistas sobre potenciais pontos de fragilidade em consequência da seca em plantas de café. A imposição da seca reduziu a atividade de PSII (com e sem OEC), e do PSI em ca. 20% apenas no regime SWD no genótipo CL153, enquanto as plantas de Icatu não foram afetadas pela seca independentemente da $[CO_2]$ (Fig. 2.5).

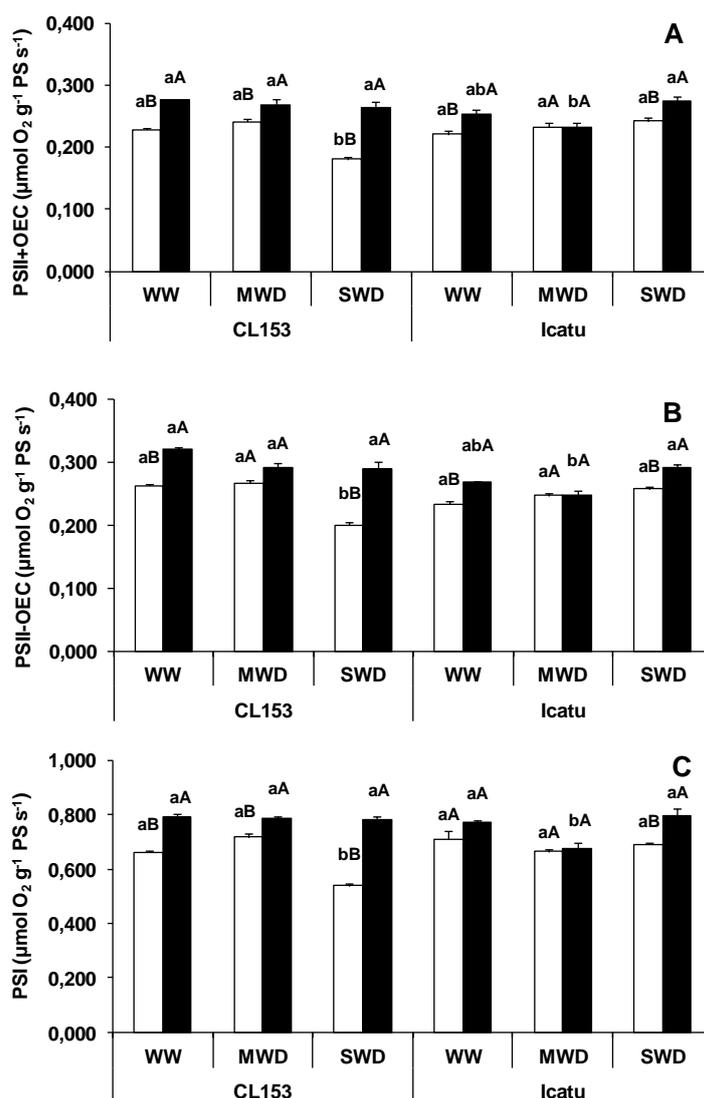


Figura 2.5. Taxas de transporte de eletrões potencial do PSII, com (+OEC) (A) ou sem (-OEC) (B) participação do OEC, e do PSI (C) em plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO_2 ambiente ($380 \mu\text{L L}^{-1}$, barras brancas) ou CO_2 elevado ($700 \mu\text{L L}^{-1}$, barras pretas) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Para cada parâmetro o valor médio \pm SE ($n = 3$) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma $[CO_2]$ (a,b,c) ou entre as duas $[CO_2]$ no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

O aumento da $[CO_2]$ reforçou a atividade dos dois fotossistemas nas plantas em conforto hídrico (WW) tanto para o PSI e PSII, atingindo aumentos de ca. 20% (CL153) e 15% (Icatu) quando comparadas com as plantas do regime WW em aCO_2 . O eCO_2 teve de uma forma geral um efeito positivo nos impactos provocados pela seca tendo mesmo invertido a tendência de perda de desempenho dos fotossistemas das plantas de CL153 sujeitas a uma seca severa (SWD) em aCO_2 .

2.3.7 Transportadores Tilacoidais de Eletrões

A exposição apenas à seca provocou diferentes alterações nos transportadores de eletrões e genótipos (Tabela 2.2). Em Icatu os teores os *Cit b₅₅₉* e *b₅₆₃* não sofreram alterações significativas, ao contrário dos aumentos significativos verificados do *Cit f* (28%) e da *PQ-9* (forma redox da plastoquinona, *PQ*) (102%) observados no regime SWD. Em contraste evidente, o CL153 teve reduções significativas em todos os citocromos, tanto em MWD como em SWD, enquanto o *PQ-9* não variou significativamente.

A exposição apenas a eCO_2 (plantas WW) não modificou de forma significativa o conteúdo destes transportadores (à exceção do *Cit b_{559HP}* em CL153 e do *Cit b₅₆₃* em Icatu). Contudo, é de salientar uma tendência sistemática de aumento de valores de todos os transportadores em ambos os genótipos, justificando o efeito globalmente significativo promovido pelo eCO_2 (Tabela suplementar S1).

Em condições de seca e eCO_2 , apesar de algumas variações entre as plantas submetidas a MWD e SWD, o eCO_2 promoveu o aumento global destes componentes fotossintéticos em condições de SWD. Na realidade, embora as plantas CL153 em aCO_2 tenham sido claramente afetadas no regime SWD, as suas homólogas a $700 \mu L L^{-1}$ de CO_2 mostraram uma ausência de impacto nos teores dos citocromos (quando comparadas com WW independentemente da $[CO_2]$) e um aumento substancial de *PQ-9*. Em Icatu o eCO_2 não atenuou os impactos negativos da SWD pois estes não aconteceram nas plantas sob aCO_2 , mas as plantas em eCO_2 submetidas a SWD mantiveram a tendência para um maior teor de todos os citocromos. É de destacar, que nos dois genótipos em MWD e sob eCO_2 os teores dos diferentes transportadores foram inferiores aos observados em SWD, embora sem impacto nas taxas de transporte de eletrões observadas (Fig. 2.5).

Tabela 2.2. Teores dos transportadores tilacoidais de eletrões, plastoquinona (PQ-9) e citocromos (Cit) *b*_{559LP}, *b*_{559HP}, *b*₅₆₃, e *f*, em plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO₂ ambiente (380 µL L⁻¹) ou CO₂ elevado (700 µL L⁻¹) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Para cada parâmetro o valor médio ± SE (n = 3) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

Genótipo	[CO ₂] (µL L ⁻¹)	Regime Hídrico	PQ-9 (nmol g ⁻¹ PS)	Cit <i>b</i> _{559LP} (nmol g ⁻¹ PS)	Cit <i>b</i> _{559HP} (nmol g ⁻¹ PS)	Cit <i>f</i> (nmol g ⁻¹ PS)	Cit <i>b</i> ₅₆₃ (nmol g ⁻¹ PS)
CL153	380	WW	318,1 ± 60,1 aA	14,49 ± 0,41 aA	16,98 ± 0,39 aB	16,74 ± 0,54 aA	26,22 ± 1,48 aA
		MWD	328,5 ± 28,5 aA	8,73 ± 0,19 bB	10,20 ± 0,14 bB	11,49 ± 0,08 bB	15,99 ± 0,10 bB
		SWD	381,0 ± 33,1 aB	10,12 ± 0,23 bB	11,83 ± 0,16 bB	13,33 ± 0,09 bB	18,54 ± 0,12 bB
	700	WW	382,6 ± 57,0 bA	15,94 ± 0,61 aA	18,36 ± 0,40 aA	17,45 ± 0,83 abA	28,20 ± 1,56 aA
		MWD	529,6 ± 12,4a bA	11,30 ± 0,21 bA	13,54 ± 0,18 bA	14,63 ± 0,08 bA	20,44 ± 0,19 bA
		SWD	774,8 ± 58,9 aA	14,56 ± 0,28 aA	17,44 ± 0,23 aA	18,85 ± 0,1 aA	26,33 ± 0,25 abA
Icatu	380	WW	315,2 ± 88,6 bA	13,49 ± 0,52 aA	15,30 ± 0,37 aA	16,35 ± 0,47 bA	26,73 ± 1,37 aB
		MWD	585,4 ± 110,8 abA	13,43 ± 0,24 aA	15,32 ± 0,21 aA	19,17 ± 0,19 abA	25,77 ± 0,21 aA
		SWD	637,8 ± 120,8 aA	14,63 ± 0,26 aA	16,69 ± 0,22 aA	20,89 ± 0,21 aA	28,07 ± 0,23 aB
	700	WW	460,4 ± 53,2 aA	15,31 ± 0,52 aA	16,26 ± 0,33 aA	18,18 ± 0,44 abA	31,67 ± 0,51 aA
		MWD	460,7 ± 17,7 aA	10,42 ± 0,26 bB	10,96 ± 0,24 bB	15,66 ± 1,32 bB	19,31 ± 0,07 bB
		SWD	585,0 ± 69,2 aA	15,86 ± 0,34 aA	18,34 ± 0,54 aA	21,96 ± 0,21 aA	31,53 ± 0,86 aA

2.3.8 Enzimas da Fotossíntese

A atividade da RuBisCO sofreu um decréscimo gradual no CL153 sob aCO₂, atingindo reduções de 40% (inicial) e 30% (total) no regime hídrico SWD (Fig. 2.6 (A) e (B)). Estes resultados contrastam de forma evidente com os observados em Icatu, onde não se observaram impactos negativos devido à imposição da seca. Os valores de ativação da RuBisCO mostraram uma certa oscilação (com uma tendência decrescente em CL153) sendo que a Ru5PK mostrou a tendência para uma maior atividade no regime MWD, sem reduções nas condições de SWD, quando comparados com os valores das plantas WW para cada genótipo.

Nas plantas em WW, o eCO₂ reforçou de forma significativa a atividade inicial (45%-61%) e total (ca. 38%) da atividade da RuBisCO, assim como a atividade da Ru5PK (ca. 50%) para os dois genótipos. Nestas mesmas circunstâncias, verificou-se também um aumento da % de ativação da RuBisCO em Icatu.

Em ambos os genótipos sob eCO₂ e em MWD observou-se uma tendência para valores mais elevados da atividade da Ru5PK e da RuBisCO (e do estado de ativação da

RuBisCO), mesmo que não significativos na maioria dos casos. Em condições de SWD esta tendência só se verificou em Icatu.

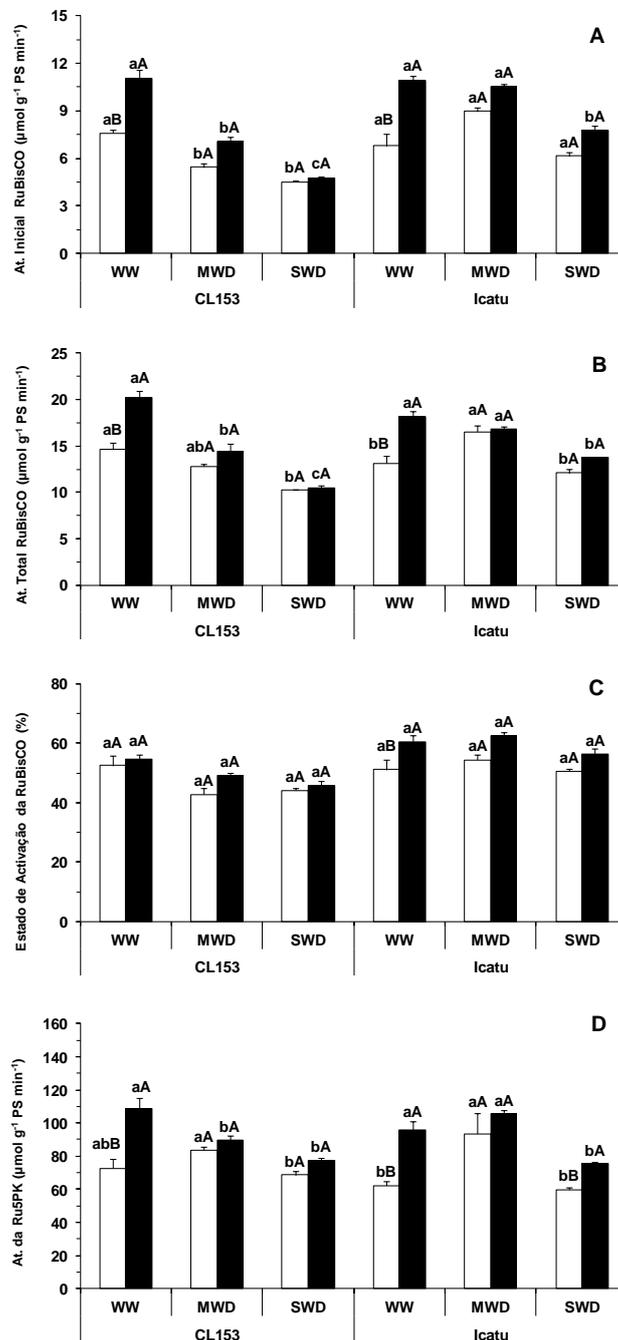


Figura 2.6. Atividade inicial (A), atividade total (B), estado de ativação da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) (C) e atividade máxima ribulose-5-fosfato quinase (Ru5PK) (D) em plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO₂ ambiente (380 μL L⁻¹, barras brancas) ou CO₂ elevado (700 μL L⁻¹, barras pretas) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Para cada parâmetro o valor médio ± SE (n = 4) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

2.3.9 Proteínas do Aparelho Fotossintético

No que diz respeito às alterações das condições ambientais, o déficit hídrico isolado (plantas sob aCO₂) foi o principal fator que influenciou o aumento da abundância da maioria das proteínas relacionadas com o aparelho fotossintético (PSI e II, OEC, LHCI e II, RuBisCO, RuBisCO Ativase e CEF-PSI) (Tabela 2.3), embora variando entre genótipos para a maioria das proteínas (Tabela S2). Na realidade, no regime de SWD observou-se uma tendência sistemática para o aumento das 26 proteínas estudadas em ambos os genótipos, mas só Icatu mostrou alterações significativas (em 15 delas).

Em contraste, o eCO₂ no regime hídrico de WW não alterou significativamente a quantidade de nenhuma das 26 proteínas em análise em ambos os genótipos. Tal está em linha com a ausência de significância para a maioria das proteínas no que se refere ao fator CO₂, bem como para a interação entre eCO₂ e genótipo (Tabela S2). Contudo, uma análise mais fina revelou uma tendência de redução da abundância de 15 proteínas em condições de eCO₂ (quando comparadas com as plantas em aCO₂) especialmente no CL153.

Quando em condições de SWD, o eCO₂ não alterou significativamente a quantidade das proteínas (com a única exceção da LHCII 21 kDa em CL153) quando comparadas com as plantas sob aCO₂.

Uma análise mais detalhada de cada grupo de proteínas, revelou que, independentemente da [CO₂], as associadas ao PSII e ao LHCII se mostraram mais abundantes em condições de seca, significativamente para algumas delas em SWD e apenas em Icatu. Neste conjunto de proteínas, incluem-se a PsbP (uma subunidade extrínseca do PSII) e PsbS (PSII 22 KDa) (como reflectido na sua interação significativa entre genótipo vs. disponibilidade hídrica – ver Tabela S2), que estão associadas à evolução do O₂ e ao mecanismo do *quenching* não fotoquímico, respetivamente. Uma maior abundância em Icatu submetido a condições de seca foi também observada para sete (sob aCO₂) e quatro (sob eCO₂) proteínas do LHCII (num universo de oito). Nas plantas CL153 ocorreu apenas o aumento significativo da proteína LHCII 21kDa, exclusivamente em eCO₂.

Um padrão semelhante ao observado para o PSII, foi igualmente observado para 10 das proteínas envolvidas no PSI, o seu LHC e com o CEF-PSI (duas proteínas do complexo NADH desidrogenase (NDH) e uma associada à regulação do gradiente de prótons (PGR5)). Em geral, a abundância destas proteínas também aumentou gradualmente com a seca, independentemente da [CO₂], mas valores significativamente mais elevados foram observados apenas nas plantas Icatu em SWD (cinco em aCO₂ ; quatro em eCO₂).

Finalmente, a RuBisCO (sub-unidade pequena) e a RuBisCO ativase mostraram uma tendência de aumento em SWD, semelhante para ambas as [CO₂], com Icatu em SWD a

revelarem os maiores aumentos, quando comparados com as suas plantas WW.

Tabela 2.3. Variação na quantidade relativa de proteínas do aparelho fotossintético, relacionadas com o PSI e II, OEC (relacionado com o PSII), LHCI e II, RuBisCO, RuBisCO ativase e associadas ao CEF dos PSs, em plantas de *C. canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *C. arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO₂ ambiente (380 µL L⁻¹) ou CO₂ elevado (700 µL L⁻¹) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Para cada parâmetro o valor médio ± SE (n = 3) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

Genótipo [CO ₂] (µL L ⁻¹) Regime Hídrico	CL153						Icatu					
	380			700			380			700		
	WW	MWD	SWD	WW	MWD	SWD	WW	MWD	SWD	WW	MWD	SWD
Fotosistema II e Complexo de Evolução do Oxigênio												
Cc07_g05350 - Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	227,4±12,0	226,7±52,9	247,7±47,0	189,7±43,2	221,7±6,7	197,7±22,4	184,7±59,9	260,3±2,9	271,0±14,9	162,3±30,2	101,3±25,8	217,7±9,2
Cc05_g00840 - Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	109,3±2,3	98,7±27,5	116,7±21,8	98,7±22,7	117,7±17,3	98,7±7,4	102,0±45,7	145,3±3,8	140,7±10,7	99,7±28,3	45,3±15,4	133,7±11,5
Cc02_g11770 - Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic	41,3±8,1	41,3±6,7	61,7±3,5	28,0±4,0	49,0±11,4	56,0±6,7	56,0±15,2	58,0±2,9	63,7±5,5	53,0±4,0	22,3±8,1*	71,7±7,3
Cc10_g11890 - Photosystem II 22 kDa protein, chloroplastic	42,0±7,0	42,3±1,8	48,3±6,0	38,3±1,9	37,7±2,4	44,7±3,7	54,3±12,3	66,7±5,4	85,0±9,3*	44,7±3,5	32,3±4,1	76,0±4,5
Cc02_g35130 - PsbP domain-containing protein 1, chloroplastic	12,7±5,7	14,7±2,2	18,0±2,0	9,3±5,5	8,3±0,3	10,3±0,9	10,3±3,5	15,7±2,2	19,3±3,0*	9,3±0,3	6,3±2,3	17,0±0,6*
Cc06_g20190 - PsbP domain-containing protein 6, chloroplastic	2,3±0,3	2,0±0,0	4,7±2,7	2,0±0,0	1,7±0,3	4,7±0,9	5,0±2,6	9,0±2,0	14,7±0,3*	4,3±1,9	1,7±0,7	15,3±0,7*
Luz- Complexo Proteico de Armazenamento do Fotosistema II												
Cc10_g16210 - Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic	28,0±6,0	28,3±8,0	54,0±15,9	30,3±9,1	36,3±7,6	54,3±8,1	39,7±18,2	75,7±6,7	96,0±14,7**	46,0±13,7	18,7±7,7	78,3±4,3*
Cc09_g09500 - Chlorophyll a-b binding protein 36, chloroplastic	15,7±4,3	18,0±6,7	30,7±9,8	19,7±6,4	18,3±6,1	35,7±3,8*	27,0±15,8	43,3±0,9	69,7±3,8*	25,0±9,5	8,7±3,2	64,0±7,2*
Cc09_g09030 - Chlorophyll a-b binding protein 21, chloroplastic	2,3±2,3	4,3±4,3	14,7±9,8	1,7±1,2	4,7±2,9	20,7±5,2*	14,3±13,8	48,9±17,9	49,0±17,9	13,3±7,3	0,3±0,3	44,7±8,4
Cc02_g21720 - Chlorophyll a-b binding protein CP24 10A, chloroplastic	5,7±2,7	7,3±3,9	17,7±8,2	7,7±2,3	8,0±3,5	17,0±4,4	8,3±5,0	12,7±0,9	21,0±3,5*	7,0±3,2	1,3±0,9	17,3±0,3*
Cc05_g12720 - Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic	4,7±1,2	3,7±0,7	9,0±2,1*	4,0±1,2	3,3±0,3	8,7±1,2*	4,7±2,9	6,0±1,2	16,0±2,3*	3,0±0,6	1,7±0,9	15,3±2,2*
Cc11_g16910 - Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	1,0±1,0	0,0±0,0	2,7±1,7	0,0±0,0	0,7±0,7	4,0±1,0*	2,7±2,7	1,3±0,3	11,7±3,3*	3,7±2,0	0,0±0,0	13,0±1,5*
Cc09_g09020 - Chlorophyll a-b binding protein 21, chloroplastic	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,3	0,3±0,3	0,7±0,7	2,3±0,3*	0,7±0,7	1,3±0,9	3,7±0,7**	0,3±0,3	0,0±0,0	4,0±1,0**
Fotosistema I												
Cc03_g03590 - Photosystem I reaction center subunit II, chloroplastic	109,0±10,5	96,0±24,0	128,0±17,1	78,3±12,5	94,7±4,3	103,0±13,7	106,0±47,4	147,0±5,3	187,3±20,2*	94,7±15,6	37,0±16,5	128,3±8,5
Cc04_g03050 - Photosystem I reaction center subunit VI, chloroplastic	14,7±6,6	12,0±6,4	39,3±12,3*	9,7±5,9	20,3±7,7	36,3±6,9	26,7±12,6	31,3±3,8	46,3±5,4*	19,7±6,4	2,7±1,2*	44,3±0,3*
Cc09_g08490 - Photosystem I reaction center subunit psaK, chloroplastic	10,3±2,4	10,3±3,4	18,3±3,9	11,3±2,3	11,0±0,0	16,0±2,5	11,7±4,3	18,3±0,9	13,0±4,7	10,0±2,1	5,3±0,9	14,0±1,5
Cc01_g15890 - Photosystem I reaction center subunit XI, chloroplastic	5,3±1,9	8,0±3,5	12,7±5,7	7,3±1,7	5,7±0,3	12,3±2,4	8,3±3,5	12,3±1,3	19,7±3,5*	7,7±2,6	2,7±0,3	17,7±1,2*
Luz- Complexo Proteico de Armazenamento do Fotosistema I												
Cc05_g09930 - Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	16,3±2,8	15,7±5,0	29,7±7,9	19,7±3,0	20,7±2,2	25,0±4,7	18,7±8,7	34,0±0,6	40,0±6,1*	23,3±5,2	10,0±5,5	36,3±3,8*
Cc09_g02010 - Chlorophyll a-b binding protein 6A, chloroplastic	7,0±2,1	6,7±2,2	15,0±5,0*	5,0±0,0	7,0±1,2	13,7±1,5	8,3±3,9	11,3±2,0	31,7±6,7*	9,3±2,7	3,7±2,2	32,0±4,6*
Cc04_g16410 - Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic	5,0±2,0	3,7±3,2	10,3±2,4	4,0±2,1	6,3±2,0	10,0±2,0	6,7±3,8	15,3±1,9	26,0±3,1*	10,7±3,0	3,0±2,5	29,3±2,6*
Fluxo Cíclico de Electrões												
Cc06_g22890 - NDH-dependent cyclic electron flow 1	2,0±1,2	3,0±1,5	3,3±1,3	3,0±2,5	4,7±1,2	3,7±1,9	3,7±1,9	6,0±0,6	9,0±1,5*	4,3±2,2	1,3±1,3	6,3±0,9
Cc04_g05100 - NDH-dependent cyclic electron flow 1	0,3±0,3	0,0±0,0	1,3±0,9	1,0±0,6	1,3±0,9	1,3±0,3	1,0±0,6	1,7±0,3	3,3±0,3*	1,7±0,9	0,0±0,0	2,7±0,7
Cc08_g13730 - PGR5-like protein 1A, chloroplastic	0,0±0,0	0,7±0,7	0,3±0,3	0,7±0,7	4,7±3,7	2,3±1,2	3,3±2,8	8,3±0,9	9,3±3,0*	6,3±3,2	1,0±1,0	11,3±1,9*
RuBisCO e RuBisCO Activase												
Cc00_g15710 - Ribulose biphosphate carboxylase small chain SSU11A, chloroplastic	46,3±7,4	49,0±8,2	58,0±8,1	51,0±10,0	62,7±27,4	53,0±5,7	51,0±17,9	78,7±20,3	79,7±5,4	47,7±11,6	25,3±5,2	82,7±3,2*
Cc02_g07500 - Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplastic	62,3±16,8	63,0±15,5	76,7±22,1	69,3±14,9	112,3±42,4	112,7±17,5	73,7±43,2	143,0±9,3	153,0±13,7	103,3±44,4	43,7±22,9	154,0±18,5
Cc04_g14500 - Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplastic	1,7±1,7	2,3±1,5	3,0±1,2	3,0±1,7	5,7±1,3	4,7±0,7	1,7±0,9	13,0±3,1**	21,0±0,6**	3,7±2,0	1,3±1,3	18,0±4,6**

2.4 DISCUSSÃO

O desenho experimental e a recolha de dados deste trabalho, tiveram por base a utilização de pseudoreplicas, tendo em conta as duas concentrações de CO₂ (Hurlbert 1984, 2004), visto cada conjunto de plantas por tratamento se ter desenvolvido em câmaras individualizadas. Em contraponto, nos diferentes tratamentos hídricos, a imposição de

restrições de água foi realizada individualmente para cada planta, até se atingir o nível de seca desejado (pelo controlo do Ψ_{pa} e pela adição parcial de água).

Mesmo não eliminando o efeito potencial das pseudoreplicas, realizaram-se trocas frequentes das plantas entre câmaras, na perspectiva de obter resultados e conclusões semelhantes às que seriam encontradas com a utilização de réplicas verdadeiras, quer em ensaio com múltiplas câmaras ou utilizando uma câmara para várias séries experimentais (Johnson *et al.* 2016). Ainda assim, considerando a possibilidade de alguns desvios estatísticos, quaisquer resultados marginalmente significativos deverão ser discutidos com cautela, sendo aconselhável, interpretar os resultados tendo em atenção o efeito do tamanho da amostra ao invés dos valores de *P per se* (Johnson *et al.* 2016). Neste sentido, feito uma referência clara à existência de pseudoreplicas e às medidas implementadas para minimizar potenciais problemas na interpretação de resultados, (Newman *et al.* 2011, Johnson *et al.* 2016), existe total confiança na solidez e utilidade da informação obtida neste estudo.

2.4.1 O Impacto da Seca no Desempenho Fotossintético e nos seus Componentes

Foi imposta uma restrição gradual de água até se atingirem valores de $\Psi_{pa} < -3,7$ MPa em ambos os genótipos para as plantas SWD, um valor que reflete um défice hídrico extremo para o cafeeiro (Pinheiro *et al.*, 2004, Brum *et al.*, 2013). Esta imposição de seca severa refletiu-se também na alteração dos índices de stresse hídrico (CWSI e I_G) (Fig. 2.2) que acompanharam a redução gradual de g_s e Ψ_{pa} , à semelhança do já observado noutras espécies de plantas (Costa *et al.*, 2013, Gómez-Bellot *et al.*, 2015), sendo estes indicadores considerados de grande utilidade para a adequação microambiental da cultura do café (Craparo *et al.*, 2017).

O declínio dos valores de g_s verificado em ambos os genótipos, quando em situação de seca estará provavelmente associado aos teores mais elevados de ABA (Fig. 2.4). O ácido abscísico tem um papel determinante na resposta estomática ao aumento da solicitação evaporativa do ar e/ou uma redução da disponibilidade hídrica do solo (Buckley, 2019), estando o aumento da síntese de ABA associado a uma maior tolerância das plantas de café à seca, através da redução dos valores de g_s , restringindo desta forma a transpiração e consequente desidratação das plantas (Silva *et al.* 2018).

Devido aos valores intrinsecamente baixos de g_s nas folhas de café, está demonstrado que a limitação estomática, mais do que a mesofílica ou bioquímica, constitui o maior constrangimento à fotossíntese nesta espécie (DaMatta *et al.*, 2019, Martins *et al.*, 2019). No

entanto, verifica-se que à medida que o déficit hídrico se agrava, as limitações não estomáticas tornam-se gradualmente predominantes. Na realidade, sob condições de MWD e SWD a redução dos valores de g_s foi acompanhada pelo aumento de C_i (Fig. 2.3 (C)), sugerindo que a fotossíntese não foi limitada por restrições estomáticas. Neste mesmo sentido, o maior declínio de P_n do que o verificado no A_{max} (este último avaliado sem limitações à difusão na fotossíntese pela utilização de uma $[CO_2]$ saturante) aponta para um aumento de restrições na difusão mesofílica do fluxo de CO_2 até aos locais de carboxilação, enquanto o declínio do A_{max} , por si só sugere estrangimentos a nível foto/bioquímicos.

Em conjunto, os resultados obtidos indicam que as limitações não estomáticas (mesofílicas e foto/bioquímicas) foram o maior estrangimento para a fotossíntese em condições de seca, tendo sido agravadas com o aumento da sua severidade, estando em linha com as mudanças bruscas de CWSI e I_G do regime MWD para o de SWD (Fig. 2.2).

As limitações não estomáticas da fotossíntese foram também confirmadas pelos impactos negativos na eficiência fotoquímica do PSII (F_v/F_m , F_v'/F_m'), na utilização fotoquímica de energia ($Y_{(II)}$, q_L) e na inativação do PSII (F_s/F_m') (Tabela 2.1). Estas alterações mostraram-se mais fortes no regime SWD do que no MWD, sendo particularmente maiores no CL153 do que em Icatu, em conformidade do impacto verificado no A_{max} .

De forma evidente, a menor utilização fotoquímica de energia, foi inteiramente compensada pelo reforço dos mecanismos fotoprotetores de dissipação térmica ($Y_{(NPQ)}$) que protegem as folhas de café dos danos provocados pela excitação excessiva (Pompelli *et al.*, 2010), associados à redução das espécies reativas de oxigénio e clorofila (Fortunato *et al.*, 2010, Dalal e Tripathy, 2018). É também de salientar, que a dissipação de energia não regulada do PSII ($Y_{(NO)}$) não aumentou em ambos os genótipos nas condições de seca. Estes dados apontam para que os processos não fotoquímicos de amortecimento (quenching), atribuíveis à fotoinativação e à dissipação não controlada de energia (calor e fluorescência) do PSII (Kramer *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 2011), não sofreram agravamentos com SWD, indicando uma tolerância intrínseca dos genótipos em estudo aos níveis de seca impostos. O genótipo Icatu demonstrou ser muito tolerante à seca tendo em conta a atividade dos PSs (Fig. 2.5) e da quantificação dos transportadores de eletrões (Tabela 2.2), tendo-se verificado uma tendência oposta no genótipo CL153 que foi claramente afetado, particularmente pela seca severa (SWD). Na realidade, embora o CL153 tenha demonstrado uma tendência consistente para uma maior abundância de proteínas relacionadas com os PSs, LHC e CEF-PSI, os aumentos só foram verdadeiramente significativos para mais de

metade das proteínas envolvidas no processo fotossintético em Icatu, refletindo mais uma vez a maior capacidade de resposta deste genótipo (Tabela 2.3).

Sabendo que a assimilação de carbono é afetada pelos diferentes stresses ambientais (o se verificou nas plantas sujeitas a SWD) e que a previsível produção de ROS poderá inibir a síntese proteica (Murata *et al.*, 2007), este trabalho mostra que o sistema teve a capacidade de sintetizar novas proteínas de forma a manter toda a capacidade de funcionamento, estando provavelmente esta resposta associada ao reforço de mecanismos antioxidativos como resposta à seca (Ramalho *et al.*, 2018b), à semelhança do já verificado em plantas de café como resposta ao frio, alta radiação e calor (Ramalho *et al.*, 1998, Fortunato *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2016).

Do conjunto de proteínas identificadas e associadas ao PSII, devem-se destacar os aumentos significativos verificados unicamente nas plantas Icatu em SWD, da PsbS (envolvida na dissipação não regulada de energia) e da PsbP, uma subunidade extrínseca do PSII envolvida na evolução de O₂, bem como na regulação do PSII, estabilização (Ifuku *et al.*, 2005), reparação e reorganização (Lu, *et al.*, 2016), estando de acordo com os bons resultados demonstrados na manutenção da atividade do PSII independentemente da [CO₂] (Fig. 2.5).

Com uma utilização reduzida de energia pelos processos fotoquímicos, o aumento resultante do gradiente transtilacoidal H⁺, irá promover a síntese de zeaxantina e a interação da proteína dimérica PsbS com a antena LHCII, que em conjunto promovem uma rápida dissipação térmica, protegendo desta forma o PSII do fotodano (Niyogi *et al.*, 2005, Ruban, 2016). Em conjunto, os dados obtidos, são consistentes com os aumentos dos teores de zeaxantina (Capítulo 3, Tabela 3.1) e com os valores de dissipação regulada de energia ($Y_{(NPQ)}$) (Tabela 2.1) no genótipo Icatu em SWD, à semelhança do que se encontra descrito para plantas de *Arabidopsis thaliana* em condições de seca (Chen *et al.*, 2016). Com estes resultados, pode-se alegar que o reforço destas duas proteínas (PsbS e PsbP) no genótipo Icatu em condições de SWD sob aCO₂, provavelmente reforçam a sua capacidade fotoprotectora, bem como a boa manutenção da evolução do O₂ no PSII (Fig. 2.5), indo também ao encontro da sua maior capacidade de resiliência à seca.

As reduções observadas da atividade potencial do PSI e PSII (Fig. 2.5) e da eficiência fotoquímica (F_v/F_m) (Tabela 2.1) no CL153 no regime SWD sob aCO₂, não estão associadas à menor quantidade de proteínas envolvidas com o PSs (Tabela 2.3).

Este facto aponta para que estas proteínas possivelmente não se encontram num estado totalmente funcional, o que poderá estar associado a uma menor eficiência dos mecanismos de proteção, como já observado em plantas de *C. canephora* sob condições de

seca (Ramalho *et al.*, 2018b). Ainda referente ao PSII, com exceção da PsbP, a quantidade de proteínas relacionadas com a evolução do O₂ manteve-se na sua maioria inalterada, o que em termos gerais corrobora com o padrão verificado na variação das taxas de transporte de elétrons no PSII, com ou sem complexo de evolução do O₂ (OEC), para ambos os genótipos (Fig. 2.5). Desta forma, podemos afirmar que o OEC não é um dos componentes sensíveis à seca em folhas de café.

Alguns dos aumentos de abundância mais expressivos, particularmente em Icatu, verificaram-se nas proteínas de ligação nos LHC a/b, que estão relacionadas com a estrutura e funcionalidade de ambos os PSs e associadas aos pigmentos antena e/ou com os centros de reação dos PSs (Kim *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2013, Pietrzykowska *et al.*, 2014). Sendo que a expressão dos genes *Lhcb* é regulada em grande medida por múltiplos sinais ambientais (Liu *et al.*, 2013) e que o funcionamento do LHCII desempenha um papel importante na prevenção dos fotodanos do PSII em condições de seca (Chen *et al.*, 2016).

Os teores mais elevados de proteínas relacionadas com o LHCII e LHCI, poderão provavelmente ter contribuído para a preservação da atividade do PSII e PSI (Fig. 2.5), da eficiência fotoquímica do PSII (F_v/F_m) (Tabela 2.1) e da capacidade de captura de energia (F_0) nas plantas de Icatu em condições de SWD, permitindo desta forma uma maior capacidade de resistência a uma seca prolongada.

Também neste sentido, o elevado e gradual aumento da PQ-9 com o défice hídrico nas plantas Icatu, deverá contribuir para a remoção do oxigénio “singlet” (¹O₂) e inibir a oxidação lipídica membranar (Ksas *et al.*, 2018), enquanto, tanto o CEF-PSII (com *Cit b₅₅₉*) como o CEF-PSI (com o complexo *Cit b_{6/f}*, PGR5 e o aumento da proteína NDH) deverão possivelmente ter sido estimulados.

Em conjunto, para o genótipo Icatu, estes processos deverão contribuir para a eficaz proteção dos PSs da fotoinibição, pela redução da excessiva pressão de excitação (Miyake e Okamura, 2003, Chu e Chiu, 2016, Yamori *et al.*, 2016), com o CEF-PSI a promover os amortecimentos não fotoquímicos de proteção (Sun *et al.*, 2018) e ainda a síntese de ATP (Yamori *et al.*, 2016). Em contraste, parece ser pouco provável que CEF-PSII e CEF-PSI tenham sido estimulados no CL153, já que os teores dos *Cits* diminuíram, estando também em linha com as diferenças significativas dos genótipos na resposta à seca para estes transportadores de elétrons (Tabela S1). De forma particular, a redução dos componentes do complexo *Cit b_{6/f}* poderá indicar uma maior sensibilidade à seca, como já referenciado para outras espécies (Kohzuma *et al.*, 2009, Sanda *et al.*, 2011).

Resumidamente, estes factos poderão ter contribuído para uma menor capacidade de transporte de elétrons (atividade dos PSs e F_v/F_m), bem como decréscimos na

fotossíntese (P_n e A_{max}), confirmando-se o que já se encontra descrito, relativamente à assimilação de carbono estar estreitamente relacionada com os conteúdos do complexo *Cit b₆/f* em condições ambientais desfavoráveis (Schöttler e Toth, 2014).

As principais enzimas do ciclo Calvin-Benson (RuBisCO e Ru5PK) têm sido utilizadas como indicadores da tolerância dos componentes bioquímicos da fotossíntese em resposta aos diferentes stresses ambientais em café (Ramalho *et al.*, 1999, 2003, Rodrigues *et al.*, 2016). Neste trabalho, ficou demonstrado que a maior sensibilidade à seca das plantas CL153 poderá provavelmente estar associado a uma significativa redução da atividade da RuBisCO (Fig. 2.6), juntamente com os impactos anteriormente descritos na atividade dos dois PSs e nos teores dos citocromos.

O impacto da seca na atividade da RuBisCO, poderá ser atribuído a uma maior desnaturação das proteínas (Hoekstra *et al.*, 2001), a uma diminuição da síntese de pequenas unidades da RuBisCO, bem como a um aumento dos inibidores de ligação da RuBisCO (Vu *et al.*, 1999, Parry *et al.*, 2002, Galmés *et al.*, 2013, Fahad *et al.*, 2017). Em contraste, a atividade da RuBisCO e da Ru5PK não foram afetadas nas plantas SWD no genótipo Icatu, o que vem ao encontro da tendência para uma maior quantidade das pequenas unidades da RuBisCO, assim como uma maior quantidade da RuBisCO ativase nas plantas em condições de seca.

Este conjunto de catalisadores tem a capacidade de modular a atividade da RuBisCO e é considerado um factor crucial na resposta das plantas às alterações climáticas (Sage *et al.*, 2008), devido à sua sensibilidade ao stresse, nomeadamente ao calor e à seca (Kumar *et al.*, 2016, Perdomo *et al.*, 2017). Destaca-se também o facto, de que para cada genótipo o estado de ativação da RuBisCO permaneceu na sua maioria inalterado, independentemente do regime hídrico ou das condições do CO₂, à semelhança do descrito em trabalhos anteriores sobre café (Ramalho *et al.*, 2003, Martins *et al.*, 2013, Dubberstein *et al.*, 2020).

2.4.2 O Impacto da Exposição Prolongada ao eCO₂ no Funcionamento do Aparelho Fotossintético

As respostas do Ψ_{pa} e da g_s não se modificaram com a exposição prolongada das plantas ao CO₂ elevado (eCO₂). Este facto corrobora com resultados anteriores para a g_s em plantas de café (Ramalho *et al.*, 2013, Ghini *et al.*, 2015, Avila *et al.*, 2020a) contrastando com muitas outras espécies, onde se verifica a redução dos valores de g_s em eCO₂ (Ainsworth e Rogers, 2007). Como as plantas de café apresentam tipicamente valores de g_s baixos e as limitações estomáticas são geralmente o maior constrangimento da fotossíntese (Martins *et al.*, 2019), é expectável que a ausência de aclimação ao eCO₂ permita maiores ganhos

foto-sintéticos (DaMatta *et al.*, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016, Avila *et al.*, 2020a). É importante salientar que neste trabalho, as plantas Icatu tenderam sistematicamente a reduzir os valores de g_s em eCO_2 , à semelhança do já verificado em trabalhos anteriores (Ramalho *et al.*, 2013), podendo estar associado a teores de ABA foliar significativamente mais elevados nas plantas de conforto hídrico (Fig. 2.4). Na realidade, mesmo quando o Ψ_{pa} não é afetado pelo eCO_2 , os aumentos na concentração de ABA foliar e xilémico, parecem promover a limitação da g_s (Fang *et al.*, 2019) por via da sinalização ABA nas células guarda dos estomas (Chater *et al.*, 2015).

Não se observou nos dois genótipos qualquer decréscimo da fotossíntese (aclimatação negativa) com a exposição prolongada ao eCO_2 , já que não se verificaram alterações significativas de P_n entre as plantas WW a 380 e 700 $\mu L CO_2 L^{-1}$, quando foram realizadas determinações para ambas as $[CO_2]$ (dados não apresentados).

O aumento evidente da P_n com o eCO_2 deverá ter por base: (i) o aumento do gradiente de CO_2 ar-folha (superando parcialmente a resistência à difusão, levando ao acréscimo da disponibilidade de CO_2 para ser assimilado pela RuBisCO) e (ii) pela redução da fotorrespiração (associada à inibição competitiva da atividade de oxigenação da RuBisCO) (DaMatta *et al.*, 2016).

Esta estimulação da P_n está de acordo com os potenciais aumentos estimados (ca. 50%) para árvores C3 (Drake *et al.*, 1997, Ainsworth e Rogers, 2007), bem como em resultados de trabalhos anteriores, obtidos em plantas de café cultivadas em campo (Ghini *et al.*, 2015). Simultaneamente estes aumentos de P_n sob eCO_2 deverão ter também beneficiado: (i) da tendência consistente para teores mais elevados dos diferentes transportadores de elétrons (Tabela 2.2), o que provavelmente terá promovido o aumento moderado da atividade potencial dos PSs (Fig. 2.5) e (ii) do reforço da atividade das enzimas envolvidas no ciclo Calvin-Benson (RuBisCO e Ru5PK). Este aumento de atividade tanto dos PSs como da RuBisCO, estão de acordo com a manutenção de um equilíbrio funcional entre a capacidade de carboxilação e do transporte de elétrons (J_{max}/V_{cmax}) que parece ser mantida nas plantas de café (Ramalho *et al.*, 2013, DaMatta *et al.*, 2016), assim como observado noutras espécies (Possell e Hewitt, 2009).

Estes investimentos nos componentes fotoquímicos e bioquímicos associados ao eCO_2 , contribuem para a ausência de desregulação do processo foto-sintético em folhas de café sujeitas à exposição prolongada ao CO_2 elevado (DaMatta *et al.*, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016). Esta tendência contrasta com a redução do potencial máximo da carboxilação e das taxas de transporte de elétrons pela redução da alocação de N para a RuBisCO, regeneração da RuBP e das proteínas associadas ao transporte de elétrons, como tem sido

descrito para muitas outras espécies (Leakey *et al.*, 2009, Bader *et al.*, 2010). Esta baixa capacidade de aclimação, está normalmente associado à redução da força de dreno (*sink*) levando a um desequilíbrio entre a síntese de fotoassimilados e a sua utilização (Long *et al.*, 2004, Ainsworth e Rogers, 2007, Tausz-Posch *et al.*, 2020). No caso do café, o ajustamento no metabolismo dos hidratos de carbono através uma particular capacidade de acumulação de amido, mostrou permitir às plantas evitar uma aclimação fotossintética, evitando a transformação e/ou acumulação de açúcares solúveis, especialmente em condições da reduzida necessidade dos drenos (DaMatta *et al.*, 2016, Avila *et al.*, 2020c).

No seu conjunto, os diferentes parâmetros da fluorescência, que refletem a eficiência fotoquímica do PSII, bem como os mecanismos fotoprotetores, permaneceram na sua maioria sem alterações com o eCO₂, à semelhança do observado na videira (Moutinho-Pereira *et al.*, 2009). Estes resultados estão de acordo com a manutenção da quantidade de grande parte das proteínas envolvidas na maquinaria fotossintética (Tabela 2.3). Entre os parâmetros de fluorescência, verificou-se uma exceção relacionada com o aumento significativo de F_0 . Este facto, associado a uma redução de F_v/F_m (que não se verificou), poderia ser visto como a indicação de danos irreversíveis de fotoinibição dos centros de reação do PSII (Pastenes e Horton, 1999), como reportado em folhas de cafeeiro submetidas a irradiação (Ramalho *et al.*, 2000) ou calor (Dubberstein *et al.*, 2020) excessivos. Contudo, no presente trabalho é improvável a ocorrência de danos por fotoinibição. Ao contrário, o aumento F_0 poderá estar associado a alterações na matriz lipídica das membranas do cloroplasto, associado ao aumento da sua fluidez (Tovuu *et al.*, 2013), como verificado em CL153 (ver Cap. 3) e/ou marcadas alterações nas classes dos galactolípidos e fosfolípidos (como em Icatu), observadas em plantas de café sob eCO₂ (Scotti-Campos *et al.*, 2019).

2.4.3 Poderá o eCO₂ Atenuar os Impactos da Seca a Nível Fotossintético em Café?

O eCO₂ retardou a diminuição do Ψ_{pa} , de forma particular nas plantas Icatu na modalidade MWD, à semelhança do observado recentemente em café (Avila *et al.*, 2020a, 2020b). Estes resultados confirmam o não agravamento do stresse de WW para MWD em condições de eCO₂ (segundo os dados de CWSI e I_G) (Fig. 2.2).

Nos genótipos de cafeeiros testados a resposta da abertura estomática foi de alguma forma influenciada pelo eCO₂ estando em concordância com resultados observados noutras espécies que referem que esta, se torna menos sensível à desidratação do solo (Li *et al.*, 2020). No regime MWD as plantas sob eCO₂ apresentaram níveis mais elevados de ABA,

quando comparados com os obtidos em aCO_2 de forma particular nas plantas de Icatu, com o valor máximo já neste regime hídrico. Contudo, estes teores elevados de ABA não tiveram um impacto correspondente nos valores de g_s , já que as plantas em eCO_2 tendem em ter valores de g_s superiores às suas congêneres com aCO_2 , não diferindo significativamente entre WW e MWD para nenhum dos genótipos. Estes resultados vêm ao encontro de respostas semelhantes observadas noutros trabalhos, em que se verificou um retardar do fecho estomático como resposta à seca em plantas de café sob eCO_2 (Avila *et al.*, 2020b), bem como em plantas de tomate (Liu *et al.*, 2019). Além disso, o eCO_2 poderá ter sido responsável pelas alterações verificadas na capacidade do controlo estomático regulado por via do ABA quando as plantas em seca moderada. De facto, o eCO_2 tem sido apontado como responsável por alterar a estreita relação entre a diminuição de g_s e o aumento dos teores de ABA xilémico, que geralmente se verifica com aCO_2 . Neste caso, a resposta estomática pode tornar-se independente/insensível ao ABA (Liu *et al.*, 2019), sendo o seu controlo regulado predominantemente pela pressão de turgescência (Yan *et al.*, 2017).

Existem ainda muitas incertezas sobre o real impacto positivo do eCO_2 nas plantas sujeitas a défices hídricos, estando este em grande medida associado às respostas diferenciadas de cada espécie (Tausz-Posch *et al.*, 2020). Alguns estudos, demonstraram impactos relativamente modestos no desempenho das plantas pelo aumento do CO_2 e que estes têm tendência a desvanecer-se com o agravamento das condições de calor e/ou seca (Birami *et al.*, 2020). Em contrapartida, outros trabalhos demonstraram que o eCO_2 pode atenuar significativamente o impacto negativo provocado pela seca no desempenho fotossintético, no desenvolvimento e no rendimento das culturas (Vanaja *et al.*, 2011, Koutavas, 2013, Wang *et al.*, 2018), como foi o caso, em plantas de café (Avila *et al.*, 2020a).

De facto, no presente trabalho, verificou-se em ambos os genótipos, um evidente atenuar do impacto de uma seca moderada (MWD) no desempenho fotossintético, estando em linha com uma consistente tendência para valores mais elevados dos parâmetros relacionados com a utilização fotoquímica de energia do PSII (F_v'/F_m' , $Y_{(II)}$, q_L) bem como a maior atividade dos PSs. Esta eficiente utilização da energia fotoquímica é em última instância o melhor mecanismo fotoprotetor (Rodrigues *et al.*, 2016), resultando numa menor necessidade dos processos de dissipação ($Y_{(NPQ)}$) e uma redução nas taxas de inativação do PSII (F_s/F_m') (Tabela 2.1). Os resultados obtidos estão em concordância com o já observado em plantas de soja sujeitas a um défice hídrico severo, onde se verificou que o eCO_2 promoveu o aumento dos valores de P_n , $Y_{(II)}$, e do quenching fotoquímico (q_P) evidenciando uma excelente tolerância desta cultura à seca associado a um maior funcionamento

fotossintético (Wang *et al.*, 2018).

O impacto da seca severa foi evidente, refletindo-se nos valores de Ψ_{pa} , CWSI, I_G e ABA, assim como nos impactos máximos na grande maioria dos parâmetros avaliados em estado de equilíbrio (e.g., P_n , g_s , F_v'/F_m' , $Y_{(II)}$, q_L , $Y_{(NPQ)}$, A_{max} e RuBisCO, embora com uma tendência para menor impacto nas plantas em eCO_2 de ambos os genótipos para a maior parte dos parâmetros. A eCO_2 promoveu um importante alívio do impacto de SWD na maquinaria fotoquímica de CL153, particularmente no F_v/F_m , na actividade dos PSs e nos teores de transportadores de eletrões, ao passo que PQ-9 mostrou o seu valor máximo, o que provavelmente promoveu o CEF-PSII, reduzindo a pressão da excitação sobre o PSII (Miyake e Okamura, 2003). Este melhor desempenho dos PSs está também em concordância com a tendência verificada para o aumento da quantidade das proteínas relacionadas com o LHCII em condições de eCO_2 , o que sugere uma maior capacidade de reparação de estruturas (Murata *et al.*, 2007). Contudo, o impacto a nível bioquímico poderá ter determinado os diferentes graus de resiliência destes genótipos já que, ao contrário de Icatu, em CL153 observou-se uma diminuição da atividade da RuBisCO em SWD, independentemente da $[CO_2]$.

Em Icatu o funcionamento potencial do aparelho fotossintético (considerando as componentes fotoquímica e bioquímica) foi escassamente afetado pela SWD em aCO_2 , pelo que a exposição a eCO_2 não se traduziu de forma evidente num melhor desempenho fotossintético. Ainda assim, verificou-se a manutenção da abundância da maioria das proteínas sob eCO_2 em condições de SWD, mantendo-se assim a capacidade de síntese *de novo* (e reparação) das estruturas fotossintéticas (Murata *et al.*, 2007). Adicionalmente, aumentou a presença de *Cit b₅₆₃* (em conjunto com a proteína PGR5) envolvido no CEF-PSI, reforçando a capacidade de síntese de ATP, que é a força motriz para os processos de reparação do PSII, que apresentam um elevado custo energético (Murata e Nishiyama, 2018). Por fim, as plantas de Icatu sujeitas a SWD mantiveram maior abundância da pequena subunidade da RuBisCO e da RuBisCO ativase, assim bem como pequenos impactos na atividade da RuBisCO (e Ru5PK) quando comparadas com o regime de conforto hídrico (WW) e independentemente da $[CO_2]$. Em conjunto, os resultados descritos anteriormente, mostram que o eCO_2 manteve a elevada resiliência intrínseca de Icatu à seca severa e melhorou o desempenho de CL153 nessas em condições.

2.5 CONCLUSÕES

Globalmente, a restrição hídrica foi o principal factor ambiental responsável pelas diferentes respostas do café em termos do funcionamento do aparelho fotossintético. Em aCO_2 , a

severidade da seca, avaliada pelo Ψ_{pa} , CWSI e I_G , afetou progressivamente as taxas de fotossíntese líquida, cuja redução se deveu mais por limitações ao nível do mesófilo e foto/bioquímico do que estomáticas. Em condições de seca, as plantas de Icatu não mostraram impactos negativos no funcionamento potencial fotossintético (e.g., A_{max} , F_v/F_m , PSs, atividade RuBisCO), bem como nos seus componentes (transportadores de eletrões), apresentando também uma maior abundância de proteínas relacionadas com o funcionamento fotossintético e com o reforço ou manutenção de alguns dos mecanismos de proteção, independentemente da $[CO_2]$. No conjunto, tal suportou a elevada resiliência em condições de déficit hídrico, contrastando com o verificado nas plantas de CL153 em condições de SWD sob aCO_2 .

No regime WW, o eCO_2 não causou “aclimatação” do aparelho fotossintético, e os aumentos significativos de P_n em ambos os génotipos resultaram fundamentalmente no decréscimo das restrições à difusão gasosa, da diminuição da fotorrespiração e do reforço global de componentes fotoquímicos (atividade dos PSs, transportadores de eletrões) e bioquímicos (RuBisCO, Ru5PK).

Em combinação com a seca, o eCO_2 atenuou o impacto da imposição de MWD sobre a maquinaria fotossintética. Por exemplo, nas plantas de Icatu o eCO_2 adiou a imposição da seca, mantendo o seu estado hídrico (Ψ_{pa} , CWSI, I_G) de WW para MWD. Em ambos os génotipos, o eCO_2 melhorou o funcionamento fotossintético, em conjunto com uma menor dissipação de energia e fotoinibição do PSII. O eCO_2 poderá também ter alterado a regulação do fecho estomático, já que as menores reduções de g_s no regime MWD se mostraram dissociados dos maiores teores de ABA (por comparação a aCO_2). Adicionalmente, os impactos marcantes provocados pelo regime SWD na maior parte dos parâmetros relacionados com a utilização de energia (através do uso fotoquímico ou de dissipação térmica) foram atenuados pelo eCO_2 , ou mesmo revertidos nalguns casos (e.g. F_v'/F_m' nas plantas de Icatu). Quando comparado com aCO_2 , nas plantas de CL153 o eCO_2 anulou o impacto de SWD na eficiência fotoquímica do PSII, na atividade dos PSs, na cadeia de transporte de eletrões e na abundância de algumas proteínas relacionadas com o LHCII. Ainda assim, a atividade da RuBisCO foi o componente fotossintético mais sensível à seca neste génotipo, independentemente da $[CO_2]$, devendo este facto constituir uma atenção especial para os programas de melhoramento, de forma a tornar esta cultura mais sustentável no futuro.

Globalmente podemos afirmar que o eCO_2 atenuou o impacto do regime MWD em ambos os génotipos, mantendo uma elevada resiliência intrínseca de Icatu e aumentando a de CL153 em condições de SWD. Em resumo, este trabalho permitiu identificar

respostas/impactos dependentes de cada genótipo associados com o aparelho fotossintético quando exposto à seca e/ou ao eCO₂, providenciando resultados relevantes no contexto da sustentabilidade da cultura do café em futuros cenários climáticos.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth, E.A., Rogers, A. (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell & Environment*, 30:258-270.
- Ainsworth, E.A., Rogers, A., Nelson, R., Long, S.P. (2004) Testing the “source–sink” hypothesis of down-regulation of photosynthesis in elevated [CO₂] in the field with single gene substitutions in *Glycine max*. *Agricultural and Forest Meteorology*, 122:85-94.
- Avila, R.T., Almeida, W.L., Costa, L.C., Machado, K.L., Barbosa, M.L., de Souza, R.P., Martino, P.B., Juárez, M.A.T., Marçal, D.M.S., Martins, S.C.V., Ramalho, J.D.C., DaMatta, F.M. (2020a) Elevated air [CO₂] improves photosynthetic performance and alters biomass accumulation and partitioning in drought-stressed coffee plants. *Environmental and Experimental Botany*, 177:104137.
- Avila, R.T., Cardoso, A.A., Almeida, W.L., Costa, L.C., Machado, K.L.G., Barbosa, M.L., de Souza, R.P.B., Oliveira, L.A., Batista, D.S., Martins, S.C.V., Ramalho, J.D.C., DaMatta, F.M. (2020b) Coffee plants respond to drought and elevated [CO₂] through changes in stomatal function, plant hydraulic conductance, and aquaporin expression. *Environmental and Experimental Botany*, 177:104148.
- Avila, R.T., Martins, S.C.V., Sanglard, L.M.V.P., Santos, M.S., Menezes-Silva, P.E., Detmann, K.C., Sanglard, M.L., Cardoso, A.A., Morais, L.E., Vital, C.E., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., DaMatta, F.M. (2020c) Starch accumulation does not lead to feedback photosynthetic downregulation in girdled coffee branches under varying source-to-sink ratios. *Trees*, 34:1-16.
- Bader, M.K.F., Siegwolf, R., Körner, C. (2010) Sustained enhancement of photosynthesis in mature deciduous forest trees after 8 years of free air CO₂ enrichment. *Planta*, 232:1115-1125.
- Birami, B., Nägele, T., Gattmann, M., Preisler, Y., Gast, A., Arneth, A., Ruehr, N.K. (2020) Hot drought reduces the effects of elevated CO₂ on tree water use efficiency and carbon metabolism. *New Phytologist*, 226:1607-1631.
- Brodribb T.J., McAdam, S.A. (2017) Evolution of the stomatal regulation of plant water content. *Plant Physiology*, 174:639-649.

- Brum, C.N., Melo, F.E., Barquero, L.O.B., Alves, J.D., Chalfun-Júnior, A. (2013) Modifications in the metabolism of carbohydrates in (*Coffea arabica* L. cv. Siriema) seedlings under drought conditions. *Coffee Science*, 8:140-147.
- Buckley, T.N. (2019) How do stomata respond to water status? *New Phytologist*, 224:21-36.
- Chater, C., Peng, K., Movahedi, M., Dunn, J.A., Walker, H.J., Liang, Y-K., McLachlan, D.H., Casson, S., Isner, J.C., Wilson, I., Neill, S.J., Hedrich, R., Gray, J.E., Hetherington, A.M. (2015) Elevated CO₂-induced responses in stomata require ABA and ABA signaling. *Current Biology*, 25:2709-2716.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103:551-560.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30:239-264.
- Chaves, M.M., Oliveira, M.M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 55:2365-2384.
- Chen, Y-E., Liu, W-J., Su, Y-Q., Cui, J-M., Zhang, X-W., Yuan, M., Zhang, H-Y., Yuan, S. (2016) Different response of photosystem II to short and long-term drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 158:225-235.
- Chu, H-A., Chiu, Y-F. (2016) The Roles of cytochrome *b₅₅₉* in assembly and photoprotection of Photosystem II revealed by site-directed mutagenesis studies. *Frontiers in Plant Science*, 6:1261.
- Costa, M.J., Grant, O.M., Chaves, M.M. (2013) Thermography to explore plant–environment interactions. *Journal of Experimental Botany*, 64:3937-3949.
- Craparo, A.C.W., Steppe, K., Van Asten, P.J.A., Läderach, P., Jassogne, L.T.P., Grab, S.W. (2017) Application of thermography for monitoring stomatal conductance of *Coffea arabica* under different shading systems. *Science of the Total Environment*, 609:755-763.
- Dalal, V.K., Tripathy, B.C. (2018) Water-stress induced downsizing of light-harvesting antenna complex protects developing rice seedlings from photo-oxidative damage. *Scientific Reports*, 8:5955.
- DaMatta, F.M. Avila, R.T., Cardoso, A.A, Martins, S., Ramalho, J.C. (2018) Physiological and agronomic performance of the coffee crop in the context of climate change and global warming: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66:5264-5274.
- DaMatta, F.M. Avila, R.T., Cardoso, A.A., Martins, S., Ramalho, J.C. (2018) Physiological and agronomic performance of the coffee crop in the context of climate change and global warming: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66:5264-5274.

- DaMatta, F.M., Godoy, A.G., Menezes-Silva, P.E., Martins, S.C.V., Sanglard, L.M, Morais, L.E., Torre-Neto, A., Ghini R. (2016) Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of Experimental Botany*, 67:341-352.
- DaMatta, F.M., Rahn, E., Läderach, P., Ghini, R., Ramalho, J.C. (2019) Why could the coffee crop endure climate change and global warming to a greater extent than previously estimated? *Climate Change*, 152:167-178.
- Davis, A.P., Chadburn, H., Moat, J, O'Sullivan, R., Hargreaves, S., Lughadha, E.N. (2019) High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. *Science Advances*, 5:eaav3473.
- Denoëud, F., Carretero-Paulet, L., Dereeper, A., Droc, G., Guyot, R., Pietrella, M. (2014) The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, 345:1181-1184.
- Drake, B.G., González-Meler, M.A., Long, S.P. (1997) More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:609-639.
- Dubberstein, D., Lidon, F.C., Rodrigues, A.R., Semedo, J.N., Marques, I., Rodrigues, W.P., Gouveia, D., Armengaud, J., Semedo, M.C., Martins, S., Simões-Costa, M.C., Moura, I., Pais, I.P., Scotti-Campos, P., Partelli, F.L., Campostrini, E., Ribeiro-Barros, A.I., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2020) Resilient and sensitive key points of the photosynthetic machinery of *Coffea* spp. to the single and superimposed exposure to severe drought and heat stresses. *Frontiers in Plant Science*, 11:1049.
- Dubberstein, D., Rodrigues, W.P., Semedo, J.N., Rodrigues, A.P., Pais, I.P., Leitão, A.E., Partelli, F.L., Campostrini, E., Reboredo, F., Scotti-Campos, P., Lidon, F.C., Ribeiro-Barros, A.I., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2018) Mitigation of the negative impact of warming on the coffee crop: The role of increased air [CO₂] and management strategies. In: Shanker A (Ed.) *Climate Resilient Agriculture, Strategies and Perspectives*, Chapter 4, IntechOpen, London, pp 57-85.
- Fahad, S., Bajwa, A.A., Nazir, U., Anjum, S.A, Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., Ihsan, M.Z., Alharby, H., Wu, C., Wang, D., Huang, J. (2017) Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science*, 8:1147.
- Fang, L., Abdelhakim, L.O.A., Hegelund, J.N., Li, S., Liu, J., Peng, X., Li, X., Wei, Z., Liu, F. (2019) ABA-mediated regulation of leaf and root hydraulic conductance in tomato grown

- at elevated CO₂ is associated with altered gene expression of aquaporins. *Horticulture Research*, 6:104.
- Fortunato, A., Lidon, F.C., Batista-Santos, P., Leitão, A.E., Pais, I.P., Ribeiro, A.I., Ramalho, J.C. (2010) Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* spp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 167: 333-342.
- Galmés, J., Aranjuelo, I., Medrano, H., Flexas, J. (2013) Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosynthesis Research*, 117: 73-90.
- 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., Bettioli, W., DaMatta, F.M. (2015) Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO₂ enrichment. *Climatic Change*, 132: 307-320.
- Gomes, M.P., Silva, A.A. (1962) Um novo diagrama triangular para a classificação básica da textura do solo. *Garcia da Orta*, 10:171-179.
- Gómez-Bellot, M.J., Nortes, P.A., Sánchez-Blanco, M.J., Ortuño, M.F. (2015) Sensitivity of thermal imaging and infrared thermometry to detect water status changes in *Euonymus japonica* plants irrigated with saline reclaimed water. *Biosystems Engineering*, 133: 21-32.
- Grant, O.M., Tronina, L., Jones, H.G., Chaves, M.M. (2007) Exploring thermal imaging variables for the detection of stress responses in grapevine under different irrigation regimes. *Journal of Experimental Botany*, 58: 815-825.
- Hasan, M.M-U., Ma, F., Prodhon Z.H., Li, F., Shen, H., Chen, Y., Wang, X. (2018) Molecular and physio-biochemical characterization of cotton species for assessing drought stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 19:2636.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 6: 431-438.
- Huang, W., Zhang, S-B., Cao, K-F. (2011) Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection of tropical trees illuminated at temporal chilling temperature. *Plant and Cell Physiology*, 52: 297-305.
- Hummel, I., Pantin, F., Sulpice, R., Piques, M., Rolland, G., Dauzat, M., Christophe, A. Pervent, M., Bouteillé, M., Stitt, M., Gibon, Y., Muller, B. (2010) Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology*, 154: 357-372.
- Hurlbert, S.H. (1984) Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*, 54:187-211.

- Hurlbert, S.H. (2004) On misinterpretations of pseudoreplication and related matters: a reply to Oksanen. *Oikos*, 104:591-597.
- Idso, S.B., Kimball, B.A. (1997) Effects of long-term atmospheric CO₂ enrichment on the growth and fruit production of sour orange trees. *Global Change Biology*, 3: 89-96.
- Ifuku, K., Yamamoto, Y., Ono, T., Ishihara, S., Sato, F. (2005) PsbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant Physiology*, 139:1175-1184.
- IPCC-Intergovernmental Panel on Climate Change (2013) *Climate Changes 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.* In: Stocker T.F., Qin D., Plattner G.-K., Tignor M.M.B., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. (Ed.) Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA, p. 203.
- IPCC-Intergovernmental Panel on Climate Change (2014): *mitigation of climate change.* In: Edenhofer O., Pichs-Madruga R., Sokona Y., Farahani E., Kadner S., Seyboth K., Adler A., Baum I., Brunner S., Eickemeier P., Kriemann B., Savolainen J., Schlömer S., von Stechow C., Zwickel T., MinxContribution J.C. (Ed.) *Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge, Cambridge University Press, UK and New York, USA, p. 1435.
- IPCC-Intergovernmental Panel on Climate Change (2018) *Summary for policymakers.* In: Masson -Delmotte V., Zhai P., Pörtner H.O., Roberts D., Skea J., Shukla P.R., Pirani A., Moufouma -Okia W., Péan C., Pidcock R., Connors S., Matthews J.B.R., Chen Y., Zhou X., Gomis M.I., Lonnoy E., Maycock T., Tignor M., Waterfield T. (Ed.) *Global warming of 1.5 °C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5 °C above pre - industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty.* World Meteorological Organization, Switzerland.
- Johnson, S.N., Gherlenda, A.N., Frew, A., Ryalls, J.M.W. (2016) The Importance of testing multiple environmental factors in legume–insect research: replication, reviewers, and rebuttal. *Frontiers in Plant Science*, 7:489.
- Kim, E-H., Li, X-P., Razeghifard, R., Anderson, J.M., Niyogi, K.K., Pogson, B.J., Chow, W.S. (2009) The multiple roles of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes define

- structure and optimize function of Arabidopsis chloroplasts: A study using two chlorophyll b-less mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787:973-984.
- Kirschbaum, M.U.F. (2011) Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies. *Plant Physiology*, 155:117-124.
- Kohzuma, K., Cruz, J.A., Akashi, K., Hoshiasu, S., Munekage, N., Okota, A., Kramer, D.M. (2009) The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought. *Plant Cell & Environment*, 32: 209-219.
- Koutavas, A. (2013) CO₂ fertilization and enhanced drought resistance in Greek firs from Cephalonia Island, Greece. *Global Change Biology*, 19: 529–539.
- Kramer, D.M., Johnson, G. Kiirats, O., Edwards, G.E. (2004) New flux parameters for the determination of Q_A redox state and excitation fluxes. *Photosynthesis Research*, 79: 209-218.
- Ksas, B., Légeret, B., Ferreti, U., Chevalier, A., Pospisil, P., Alric, J., Havaux, M. (2018) The plastoquinone “pool” outside the thylakoid membrane serves in plant photoprotection as a reservoir of singlet oxygen scavengers. *Plant Cell & Environment*, 41:2277-2287.
- Kumar, R.R., Goswami, S., Singh, K., Dubey, K., Rai, G.K., Singh, B., Singh, S., Grover, M., Mishra, D., Kumar, S., Bakshi, S., Rai, A., Pathak, H., Chinnusamy, V., Praveen, S. (2018) Characterization of novel heat-responsive transcription factor (TaHSFA6e) gene involved in regulation of heat shock proteins (HSPs) - A key member of heat stress-tolerance network of wheat. *Journal of Biotechnology*, 279:1-12.
- Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., Bekkaoui, F. (2018) Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6:26.
- Lang, Y., Wang, M., Xia, J., Zhao, Q. (2018) Effects of soil drought stress on photosynthetic gas exchange traits and chlorophyll fluorescence in *Forsythia suspense*. *Journal of Forestry Research*, 29:45-53.
- Leakey, A.D., Ainsworth, E.A., Bernacchi, C.J., Alistair, R., Long, S.P., Ort, D.R. (2009) Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2859-2876.
- Li, B., Feng, Y., Zong, Y., Zhang, D., Hao, X., Ping Li, P. (2020) Elevated CO₂-induced changes in photosynthesis, antioxidant enzymes and signal transduction enzyme of soy bean under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154:105-114.
- Liu, J., Hu, T., Fang, L., Peng, X., Liu, F. (2019) CO₂ elevation modulates the response of leaf gas exchange to progressive soil drying in tomato plants. *Agricultural and Forest Meteorology*, 268:181-188.

- Liu, R., Xu, Y.H., Jiang, S.-C., Lu, K., Lu, Y.-F., Feng, X.-J., Wu, Z., Liang, S., Yu, Y.-T., Wang, X.-F., Zhang, D.-P. (2013) Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins, positively involved in abscisic acid signalling, require a transcription repressor, WRKY40, to balance their function. *Journal of Experimental Botany*, 64:5443-5456.
- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Rogers, A., Ort, D.R. (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annual Review of Plant Biology*, 55:591-628.
- Lu, Y. (2016) Identification and roles of photosystem II assembly, stability, and repair factors in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 7:168.
- Magrath, A., Ghazoul, J. (2015) Climate and pest-driven geographic shifts in global coffee production: Implications for forest cover, biodiversity and carbon storage. *PLoS ONE* 10:e0133071.
- Martins L.D., Tomaz M.A., Lidon F.C., DaMatta F.M., Ramalho J.C. (2014) Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. *Climatic Change*, 126:365-379.
- Martins, M.Q., Rodrigues, W.P., Fortunato, A.S., Leitao, 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. (2016) Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *Coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*, 7:947.
- Martins, S.C.V., Detmann, K.C., Reis, J.V., Pereira, L.F., Sanglard, L.M.V.P., Rogalski, M., DaMatta, F.M. (2013) Photosynthetic induction and activity of enzymes related to carbon metabolism: insights into the varying net photosynthesis rates of coffee sun and shade leaves. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25:62-69.
- Martins, S.V.C., Sanglard, M.L., Morais, L.E., Menezes-Silva, P.E., Mauri, R., Avila, R.T., Vital, C.E., Cardoso, A.A., DaMatta, F.M. (2019) How do coffee trees deal with severe natural drought? An analysis of hydraulic, diffusive and biochemical components at the leaf level. *Trees*, 33:1679-1693.
- Matos, M.C., Campos, P.S., Ramalho, J.C., Medeira, M.C., Maia, M.I., Semedo, J.N., Marques, N., Matos, A. (2002) Photosynthetic activity and cellular integrity of the Andean legume *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi under heat and water stress. *Photosynthetica*, 40:493-501.
- Miyake, C., Okamura, M. (2003) Cyclic electron flow within PSII protects PSII from its photoinhibition in thylakoid membranes from spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 44:457-462.

- Moutinho-Pereira, J., Gonçalves, B., Bacelar, E., Cunha, J.B., Coutinho, J., Correia, C.M. (2009) Effects of elevated CO₂ on grapevine (*Vitis vinifera* L.): Physiological and yield attributes. *Vitis*, 48:159-165.
- Muller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M., Gibon, Y. (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany*, 62:1715-1729.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1767 (6):414-421.
- Murata, N., Nishiyama, Y. (2018) ATP is a driving force in the repair of photosystem II during photoinhibition. *Plant Cell & Environment*, 41:285-299.
- Newman, J.A., Anand, M., Henry, H.A.L., Hunt, S., Gedalof, Z. (2011) *Climate Change Biology*. Wallingford, UK: CABI.
- Niyogi, K.K., Li, X-P., Rosenberg, V., Jung, H-S. (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, 56:375-382.
- Norby R.J., DeLucia E.H., Gielen B., Calfapietra C., Giardina C.P., King J.S., Ledford J., McCarthy H.R., Moore D.J.P., Ceulemans R., De Angelis P., Finzi A.C., Karnosky D.F., Kubiske M.E., Lukac M., Pregitzer K.S., Scarascia-Mugnozza G.E., Schlesinger W.H., Oren R. (2005) Forest response to elevated CO₂ is conserved across a broad range of productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 102:18052-18056.
- Otorio, N. (2002) *The Global Coffee Crisis: A Threat to Sustainable Development*. International Coffee Organization, London.
- Parry, M.A., Andralojc, P.J., Khan, S., Lea, P.J., Keys, A.J. (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany*, 89:833-839.
- Pastenes, C., Horton, H. (1999) Resistance of photosynthesis to high temperature in two bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). *Photosynthesis Research*, 62:197-203.
- Perdomo, J.A., Capó-Bauçà, S., Carmo-Silva, E., Galmés, J. (2017) RuBisCO and RuBisCO activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit. *Frontiers in Plant Science*, 8:490.
- Pietrzykowska, M., Suorsa, M., Semchonok, D.A., Tikkanen, M., Boekema, E.J., Aro. E-M., Jansson, S. (2014) The Light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins Lhcb1 and Lhcb2

- play complementary roles during state transitions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26:3646-3660.
- Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B., Loureiro, M.E. (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, 167:1307-1314.
- Pompelli, M.F., Martins, S.C.V., Antunes, W.C., Chaves, A.R.M., DaMatta, F.M. (2010) Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. *Journal of Plant Physiology*, 167:1052-1060.
- Possell, M., Hewitt, C.N. (2009) Gas exchange and photosynthetic performance of the tropical tree *Acacia nigrescens* when grown in different CO₂ concentrations. *Planta*, 229:837-846.
- Rakocevic, M., Braga, K.S.M., Batista, E.R., Maia, A.H.N., Scholz, M.B.S., Filizola, H.F. (2020) The vegetative growth assists to reproductive responses of Arabic coffee trees in a long-term FACE experiment. *Plant Growth Regulation*, 91:305-316.
- Ramalho, J.C., Campos, P.S., Quartin, V.L., Silva, M.J., Nunes, M.A. (1999) High irradiance impairments on electron transport, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and N assimilation as function of N availability in *Coffea arabica* L. plants. *Journal of Plant Physiology*, 154:319-326.
- Ramalho, J.C., Campos, P.S., Teixeira, M., Nunes, M.A. (1998) Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Science*, 135:115-124.
- 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. (2014) Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 26:5-18.
- Ramalho, J.C., Pais, I.P., Leitão, A.E., Guerra, M., Reboredo, F.H., Máguas, C.M., Carvalho, M.L., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.C., DaMatta, F.M. (2018a). Can elevated air [CO₂] conditions mitigate the predicted warming impact on the quality of coffee bean? *Frontiers in Plant Science*, 9:287.
- Ramalho, J.C., Pons, T., Groeneveld, H., Azinheira, H.G. e Nunes, M.A. (2000) Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: Role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Functional Plant Biology (ex- Australian Journal of Plant Physiology)*, 27:43-51.
- Ramalho, J.C., Quartin, V., Leitão, A.E., Campos, P.S., Carelli, M.L., Fahl, J.I., Nunes, M.A. (2003) Cold acclimation ability of photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. *Plant Biology*, 5:631-641.

- Ramalho, J.C., Rodrigues, A.P., Lidon, F.C., Marques, L.M.C., Leitão, A.E., Fortunato, A.F., Pais, I.P., Silva, M.J., Scotti-Campos, P., Lopes, A., Reboredo, F.H., Ribeiro-Barros, A.I. (2018b) Stress cross-response of the antioxidative system promoted by superimposed drought and cold conditions in *Coffea* spp. *PloS ONE* 13(6):e0198694.
- 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. (2013) Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. *PloS ONE* 8:e82712.
- Ramos, T.B., Gonçalves, M.C., Brito, D., Martins, J.C., Pereira, L.S., (2013). Development of class pedotransfer functions for integrating water retention properties into Portuguese soil maps. *Soil Research* 51: 262-277.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanandan, M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161:1189-1202.
- Rodrigues, M.L., Santos, T.P., Rodrigues, A.P., de Souza, C.R., Lopes, C.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., Chaves, M.M., (2008) Hydraulic and chemical signalling in the regulation of stomatal conductance and plant water use in field grapevines under water deficit irrigation. *Functional Plant Biology*, 35:565–579.
- 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., Goulão, 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. (2016) Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *Coffea canephora* species. *Global Change Biology*, 22:415-431.
- Ruban, A.V. (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Biology*, 170:1903-1916.
- Sage, R.F., Way, D.A., Kubien, D.S. (2008) Rubisco, Rubisco activase, and global climate change. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1581-1595.
- Sanda, S., Yoshida, K., Kuwano, M., Kawamura, T., Munekage, Y.N., Akashi, K., Yokoda, A. (2011) Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. *Physiologia Plantarum*, 142:247-264.
- Schölander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D., Emingsen, E.A. (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science*. 148:339-346.

- Schöttler, M.A., Toth, S.Z. (2014) Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: environmental acclimation and photosynthetic flux control. *Frontiers in Plant Science*, 5:188.
- Scotti-Campos, P., Pais, I.P., Ribeiro-Barros, A.I., Martins, L.D., Tomaz, M.A., Rodrigues, W.P., Campostrini, E., Smedo, J.N., Fortunato, A.S., Martins, M.Q., Partelli, F.L., Lidon, F.C., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2019) Lipid profile adjustments may contribute to warming acclimation and to heat impact mitigation by elevated [CO₂] in *Coffea* spp. *Environmental and Experimental Botany*, 167:103856.
- Smedo, J.N., Rodrigues, W.P., Martins, M.Q., Martins, L.D., Pais, I.P., Rodrigues, A.P., Leitão, A.E., Partelli, F.L., Campostrini, E., Tomaz, M.A., Reboredo, F.H., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.C., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2018) Coffee responses to drought, warming and high [CO₂] in a context of future climate change scenarios. In: Alves F., Leal W., Azeiteiro U (Ed.) *Theory and Practice of Climate Adaptation*, 26, Climate Change Management Series, Springer, Cham, Switzerland, pp 465-477.
- Silva, V.A., Prado, F.M., Antunes, W.C., Paiva, R.M., Ferrão, M.A.G., Andrade, A.C., Di Mascio, P., Loureiro, M.E., DaMatta, F.M., Almeida, A.M. (2018) Reciprocal grafting between clones with contrasting drought tolerance suggests a key role of abscisic acid in coffee acclimation to drought stress. *Plant Growth Regulation*, 85:221-229.
- Souza, C.R., Maroco, J., Santos, T.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C., Pereira, J.S., Chaves, M.M. (2005) Control of stomatal aperture and carbon uptake by deficit irrigation in two grapevine cultivars. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106:261-274.
- Sun, Y., Gao, Y., Wang, H., Yang, X., Zhai, H., Du, Y (2018) Stimulation of cyclic electron flow around PSI as a response to the combined stress of high light and high temperature in grape leaves. *Functional Plant Biology*, 45:1038-1045.
- Tausz-Posch, S., Tausz, M., Bourgault, M. (2020) Elevated [CO₂] effects on crops: Advances in understanding acclimation, nitrogen dynamics and interactions with drought and other organisms. *Plant Biology*, 22 (Suppl. 1):38-51.
- Tazoe, Y., Hanba, Y.T., Furumoto, T., Noguchi, K., Terashima, I. (2008) Relationships between quantum yield for CO₂ assimilation, activity of key enzymes and CO₂ leakiness in *Amaranthus cruentus*, a C₄ dicot, grown in high or low light. *Plant and Cell Physiology*, 49:19-29.
- Tovuu, A., Zulfugarov, I.S., Lee, C. (2013). Correlations between the temperature dependence of chlorophyll fluorescence and the fluidity of thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*, 147:409-416.

- van der Vossen, H., Bertrand, B., Charrier, A. (2015) Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): A review. *Euphytica*, 204:243-256.
- Vanaja, M., Yadav, S.K., Archana, G., Lakshmi, N.J., Reddy, R., Vagheera, P., Razak, S.K.A., Maheswari, M., Venkateswarlu, B. (2011) Response of C4 (maize) and C3 (sunflower) crop plants to drought stress and enhanced carbon dioxide concentration. *Plant, Soil and Environment*, 57:207-215.
- von Caemmerer, S. and Farquhar, G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153:376-387.
- Vu, J.C.V., Gesch, R.W., Allen, L.H., Boote, K.J., Bowes, G. (1999) CO₂ enrichment delays a rapid, drought-induced decrease in Rubisco small subunit transcript abundance. *Journal of Plant Physiology*, 155:139-142.
- Wang, A., Lam, S.K., Hao, X., Li, F.Y., Zong, Y., Wang, H., Li, P. (2018) Elevated CO₂ reduces the adverse effects of drought stress on a high-yielding soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar by increasing water use efficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132:660-665.
- Wang, Y., Xu, C., Wu, M., Chen, G. (2016) Characterization of photosynthetic performance during reproductive stage in high-yield hybrid rice LYPJ exposed to drought stress probed by chlorophyll a fluorescence transient. *Plant Growth Regulation*, 81:489-499.
- Xiong, L., Wang, R-G., Mao, G., Koczan, J.M. (2006) Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiology*, 142:1065-1074.
- Yamori, W., Makino, A., Shikanai, T. (2016) A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. *Scientific Reports*, 6:20147.
- Yan, F., Li, X., Liu, F. (2017) ABA signaling and stomatal control in tomato plants exposure to progressive soil drying under ambient and elevated atmospheric CO₂ concentration. *Environmental and Experimental Botany*, 139:99-104.
- Yang, L., Huang, J., Yang, H., Dong, G., Li, G., Zhu, J., Wang, Y. (2006) Seasonal changes in the effects of free-air CO₂ enrichment (FACE) on dry matter production and distribution of rice (*Oryza sativa* L.). *Field Crops Research*, 98:12-19.
- Zargar, S.M., Gupta, N., Nazir, M., Mahajan, R., Malik, F.A., Sof, N.R., Shikari, A.B., Salgotra, R.K. (2017) Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. *Plant Gene*, 11:154-159.

3. PAPEL DOS MECANISMOS DE PROTEÇÃO E DINÂMICA DA MATRIZ LIPÍDICA DAS MEMBRANAS DO CLOROPLASTO NA RESPOSTA AO DÉFICE HÍDRICO E À SUA INTERAÇÃO COM O AUMENTO DA [CO₂] ATMOSFÉRICA

3. PAPEL DOS MECANISMOS DE PROTEÇÃO E DINÂMICA DA MATRIZ LIPÍDICA DAS MEMBRANAS DO CLOROPLASTO NA RESPOSTA AO DÉFICE HÍDRICO E À SUA INTERAÇÃO COM O AUMENTO DA [CO₂] ATMOSFÉRICA

RESUMO

A seca é um dos fatores abióticos mais críticos para as culturas, afectando fortemente a assimilação de carbono, o crescimento e a produtividade. Num contexto de alterações climáticas, é importante estudar e compreender a interação entre o aumento esperado da [CO₂] atmosférica e a escassez de água, no sentido de garantir a sustentabilidade da produção de café. Neste âmbito, pretendeu-se avaliar os mecanismos de resposta à seca e a interação desta com a [CO₂] elevada em genótipos das duas principais espécies produtoras *Coffea* spp., focando os mecanismos fotoprotectores, antioxidativos e a capacidade de remodelação das membranas do cloroplasto. Para tal foram utilizadas plantas envasadas com sete anos de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* L. cv. Icatu, desenvolvidas sem limitação hídrica (WW), sob [CO₂] de 380 (aCO₂) ou 700 μL L⁻¹ (eCO₂). Estas plantas foram então gradualmente expostas a défice hídrico moderado (MWD) e severo (SWD), atingindo potenciais hídricos de pré alvorada entre -1,6 e -2,1 MPa (MWD), e inferiores a -3,5 MPa (SWD). As avaliações incluíram o impactos ao nível do funcionamento dos fotossistemas (fotoinibição do PSII), a presença de um conjunto de moléculas protetoras (xantofilas, carotenos, HSP70), e antioxidantes (enzimas superóxido dismutase, Cu,Zn-SOD, ascorbato peroxidase, APX, glutathione redutase, GR, ascorbato), bem como o impacto na seletividade membranar (I%), e as alterações na composição lipídica das membranas do cloroplasto (em ácidos gordos, AGs), e seu grau de insaturação (DBI). Em MWD, independentemente do genótipo e da [CO₂] não ocorreu aumento nos índices de fotoinibição do PSII e no dano membranar, mas em SWD em aCO₂ foram evidentes impactos negativos em CL153 mas não em Icatu. Esta maior resiliência de Icatu em SWD resultará de um maior reforço dos mecanismos de fotoproteção e controlo antioxidativo (aumento de teores de zeaxantina, luteína e ascorbato, e das actividades de Cu,Zn-SOD e APX), de HSP70, assim como de maior síntese *de novo* de AGs para as membranas do cloroplasto. Adicionalmente, o eCO₂, atenuou o impacto da SWD em CL153 (e.g., redução da fotoinibição crónica e I%), mas ambos os genótipos mostram tendências para um reforço adicional (nem sempre significativo) de diversos elementos de proteção (e.g., *pool* do ciclo das xantofilas, luteína, Cu,Zn-SOD, APX,

ascorbato), e de HSP70 apenas em Icatu, e redução do DBI (significativo em CL153), sempre em comparação com plantas de aCO₂ em SWD. Em conjunto, os dados obtidos mostram que a maior resiliência de Icatu em SWD será suportada por uma maior resposta de proteção. Por outro lado, eCO₂ aumentou a tolerância de CL153 em condições de SWD, ligado ao reforço do controlo de moléculas reactivas e alterações na matriz lipídica das membranas dos cloroplastos (que ocorre igualmente em Icatu). Assim, um aumento da [CO₂] atmosférica contribuirá para mitigar os impactos do défice hídrico num cenário de alterações climáticas, onde é expectável uma menor disponibilidade de água.

Palavras-chave: aclimação, cafeeiro, CO₂ elevado, lípidos, membranas celulares, seca, stresse oxidativo.

3.1 INTRODUÇÃO

O equilíbrio hídrico, a preservação da integridade membranar celular e do funcionamento metabólico em geral, são fundamentais para a manutenção da normal atividade da planta. A síntese e acumulação de osmolitos (entre os quais os açúcares não-estruturais), proteínas osmoprotectoras e de diferentes moléculas com papel antioxidante, encontram-se entre os processos comuns à aclimação das plantas a stresses ambientais (El-Bashiti *et al.*, 2005, Abdul Jaleel *et al.*, 2007, Verslues *et al.*, 2006, Ramalho *et al.*, 2014, Martins *et al.*, 2016, Dumond e Rivoal, 2019).

Um défice hídrico moderado a severo, ainda que de curta duração, pode inibir de forma relevante diversos componentes do metabolismo fotossintético, com consequências mais ou menos gravosas no crescimento e desenvolvimento vegetal. Uma das primeiras respostas ao défice hídrico está frequentemente relacionada com o fecho dos estomas, de forma de controlar a perda de água por transpiração, mas com níveis mais severos os impactos não-estomáticos (*e.g.*, ao nível foto e bioquímico) terão uma importância crescente (Chaves *et al.*, 2003, Matos *et al.*, 2010, Ramalho *et al.*, 2014, Scotti-Campos *et al.*, 2013, Semedo *et al.*, 2021). Adicionalmente, a severidade do stresse aumenta se o défice hídrico ocorrer em simultâneo com outras condições limitantes, nomeadamente temperatura elevada e alta irradiância, favorecendo a fotoinibição da fotossíntese (Powles, 1984) e limitando os processos celulares de forma mais abrangente e intensa.

Condições ambientais desfavoráveis que limitem o uso fotoquímico de energia, nomeadamente através do fecho estomático (como na resposta ao défice hídrico), reduz o acesso de CO₂ aos locais de carboxilação, promovem a produção de moléculas altamente reativas de Chl e O₂ (nomeadamente as ROS, radical superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxilo

(OH[•]), peróxido de hidrogénio (H₂O₂), e oxigénio “singlet” (¹O₂)), exacerbando as condições de stresse oxidativo celular, e causando danos nas estruturas celulares, nomeadamente nos cloroplastos, ao nível das proteínas que constituem o PSII e dos lípidos das membranas (Apel e Hirt, 2004, Møller *et al.*, 2007, Ramalho *et al.*, 2013, Barbosa *et al.*, 2014, Scotti-Campos *et al.*, 2016, Yamamoto, 2016, Awasthi *et al.*, 2017, Raja *et al.*, 2017, Ramalho *et al.*, 2018a, Dumanović, *et al.* 2021), bem como uma fotoinibição crónica que pode diminuir significativamente a produtividade das plantas (Chaves *et al.*, 2008).

De entre os principais mecanismos de proteção contra a produção de ROS encontram-se os pigmentos fotoprotetores (por exemplo, de zeaxantina, luteína, carotenos) que funcionam como mecanismos de dissipação do excesso de energia ao nível dos complexos antena e centros de reação dos fotossistemas (Demming-Adams *et al.*, 1996, Ramalho *et al.*, 2000, Martins *et al.*, 2016, Ramalho *et al.*, 2018a, Giossi *et al.* 2020, Dumanović, *et al.* 2021). A estes juntam-se frequentemente os mecanismos que removem as ROS, nomeadamente um conjunto de enzimas antioxidantes, entre as quais Cu,Zn-superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT) (Choudhury *et al.*, 2017, Noctor *et al.* 2018, Dumanović, *et al.* 2021). Atuando de forma complementar, diversas moléculas não-enzimáticas podem também estar envolvidas, nomeadamente o ascorbato (ASC), glutatião reduzido (GSH), e ainda outras moléculas protetoras, como açúcares da família da rafinose (RFOs) ou a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) que é usual em condições de calor, mas que também se revela importante em situações de seca, ajudando na reorganização e na preservação das proteínas, contribuindo para o equilíbrio intercelular (Mittler 2002, Choudhury *et al.*, 2017, Anaraki *et al.*, 2018, Cassia *et al.* 2018).

As ROS causam frequentemente degradação membranar através da lipoperoxidação de ácidos gordos poli-insaturados (PUFAs) (Higashi *et al.*, 2015, Niu e Xiang, 2018, Scotti-Campos *et al.*, 2019), os quais podem ainda ser degradados pela ação de fosfolipases e galactolipases, que são igualmente estimuladas em condições de stresse (Sahsah *et al.*, 1998), causando no seu conjunto impactos a nível estrutural e metabólico que, em situações extremas, poderão levar à morte celular (Menezes-Silva *et al.*, 2017, Yang *et al.*, 2018, Scotti-Campos, *et al.*, 2019). Contudo, embora particularmente sensíveis aos stresses ambientais, as membranas apresentam também uma dinâmica de alterações na sua composição (*e.g.*, da matriz lipídica) de forma a manter a fluidez, integridade e função, enquanto parte integrante e fundamental da resposta de aclimação às condições ambientais envolventes (Ruelland *et al.*, 2015, Niu e Xiang, 2018, Liu *et al.*, 2019), constituindo um importante indicador da tolerância a stresses (Bukhov *et al.*, 1999,

Yamamoto, 2016, Liu *et al.*, 2019). A matriz lipídica das membranas cloroplastidiais é constituída maioritariamente por lípidos polares (fosfolípidos e galactolípidos), sendo que as funções associadas a essas membranas dependem em grande parte da sua fluidez, que é assegurada em larga medida pela preponderância de ácidos gordos insaturados, já que as duplas ligações *cis* nas suas cadeias induzem a formação de curvaturas que aumentam a flexibilidade dessas mesmas cadeias (Xin e Browse, 2000). Assim, a remodelação lipídica das membranas do cloroplasto através de síntese *de novo* ou modificação dos ácidos gordos pré-existentes, desempenha um papel crucial na aclimação das plantas (incluindo o cafeeiro) aos stresses abióticos como o frio (Wang *et al.*, 2006, Partelli *et al.*, 2011, Tovuu *et al.*, 2013, Scotti-Campos *et al.*, 2014), calor (Iba, 2006, Higashi *et al.*, 2015, Scotti-Campos *et al.*, 2019), salinidade (Scotti-Campos *et al.*, 2016) e seca (Torres-Franklin *et al.*, 2009, Scotti-Campos *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2018 Liu *et al.*, 2019).

São ainda poucos os estudos dedicados ao contributo potencial que o aumento da [CO₂] atmosférica pode ter para atenuar os efeitos negativos da seca nas plantas (Zinta *et al.*, 2014, Abo Gamar *et al.*, 2019), nomeadamente em cafeeiro (Avila *et al.*, 2020a,b, Semedo *et al.*, 2021), e ainda há grandes lacunas na compreensão da razão pela qual se observa um efeito positivo. De facto, o aumento da [CO₂] atmosférica tem um impacto direto nos processos fotossintéticos e respiratórios (Ainsworth e Rogers, 2007, Kirschbaum, 2011, DaMatta *et al.*, 2019), observando-se frequentemente acréscimos próximos ou superiores a 50% na taxa de fotossíntese líquida, nomeadamente em espécies lenhosas (Ainsworth e Rogers, 2007), incluindo o cafeeiro (Ramalho *et al.*, 2013, Ghini *et al.*, 2015, Rodrigues *et al.*, 2016, Avila *et al.*, 2020a, Semedo *et al.*, 2021). Contudo, as alterações climáticas poderão comprometer os efeitos benéficos do aumento da [CO₂] na fotossíntese, no crescimento e na produção de biomassa vegetal, o que dependerá das espécies e da presença de outros stresses, da sua severidade e duração (Abo Gamar *et al.*, 2019, Birami *et al.*, 2020, Tausz-Posch *et al.*, 2020). Por outro lado, para além do melhor desempenho fotossintético, tem sido reportado que níveis elevados de [CO₂] poderão ter um papel positivo na resposta aos stresses ambientais, atenuando os impactos através do reforço de diferentes mecanismos de proteção (Leakey *et al.*, 2012, Martins *et al.*, 2016, Dumanović, *et al.*, 2021). Estará também dependente da capacidade das plantas de cada espécie/genótipo desencadearem respostas que lhes permitam tolerar tais stresses, a que acresce ao facto do aumento de [CO₂] diminuir a probabilidade de produção e persistência de moléculas altamente reativas de Chl e O₂ quer pela redução da taxa de fotorespiração, quer por maior uso de energia em processos fotoquímicos (Rodrigues *et al.*, 2016).

Neste contexto, este trabalho pretende aprofundar o conhecimento relativo aos

componentes dos mecanismos de aclimação à seca, nomeadamente os antioxidativos e as modificações ao nível dos lípidos cloroplastidiais, assim como contribuir para aumentar o conhecimento relativamente ao papel do aumento da [CO₂] atmosférica na preservação do funcionamento da maquinaria fotossintética em condições de défice hídrico, em dois génotipos cultivados das duas principais espécies produtoras de *Coffea* spp.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Material Vegetal e Condições de Crescimento

Utilizaram-se plantas de dois génotipos de *Coffea* spp., das duas principais espécies produtoras, *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* L. cv. Icatu Vermelho. O desenho experimental, incluindo as condições de crescimento, foi implementado como descrito no Capítulo 2.

3.2.2 Imposição dos Regimes Hídricos e Avaliação do Nível de Déficit

As condições hídricas estudadas foram as de conforto hídrico (WW, “well watered”), seca moderada (MWD, “moderate water deficit”) e seca severa (SWD, “severe water deficit”), tendo sido impostas de acordo com o descrito no Capítulo 2.

As determinações do potencial hídrico foliar Ψ_{pa} foram realizadas segundo o método de Schölander *et al.* (1965).

3.2.3 Estado da Fotoinibição PSII

Os índices de fotoinibição do PSII foram calculados segundo Werner *et al.* (2002), incluindo: 1) a fotoinibição crónica (PI_{Chr}), representando a percentagem de redução de F_v/F_m em cada tratamento em relação ao F_v/F_m máximo obtido durante todo o ensaio; 2) a fotoinibição dinâmica (PI_{Dyn}), representando o declínio em F_v/F_m que é totalmente reversível durante a noite, sendo medido como a redução de percentagem no meio-dia F'_v/F'_m , em relação a F_v/F_m para cada tratamento, em relação ao máximo F_v/F_m de todo o ensaio; e 3) a fotoinibição total (PI_{Total} = PI_{Chr} + PI_{Dyn}). F_v/F_m e F'_v/F'_m representam, respetivamente, a eficiência fotoquímica máxima do PSII e a eficiência fotoquímica do PSII em condições de iluminação. Tanto F_v/F_m e F'_v/F'_m foram obtidos em folhas perfeitamente adaptadas à escuridão ou em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese, respetivamente (Rodrigues *et al.* 2016), conforme descrito no Capítulo 2.

3.2.4 Determinação dos Pigmentos Fotossintéticos

Para avaliação do teor de clorofilas e de carotenoides usaram-se amostras congeladas de 3 discos foliares (0,5 cm²cada), maceradas 1,5 mL de acetona a 90% (v/v). Após centrifugação (10000 g, 10 min, 4°C) e filtragem (filtro de nylon 13 mm, 0,45 µm), retirou-se uma alíquota que foi diluída para acetona a 80%, sendo as clorofilas determinadas espectrofotometricamente utilizando os coeficientes de Lichtenthaler (1987).

A restante parte da amostra filtrada foi analisada por HPLC, em coluna C18 de fase reversa, Spherisorb ODS-2 (250 x 4,6 mm, 5 µm) com colunas guarda do mesmo material, seguindo os procedimentos descritos em Ramalho *et al.* (1997). A detecção foi realizada a 440 nm, num sistema de HPLC (Beckman, System Gold, Tulsa, EUA) acoplado a um detector de diodos (Modelo 168; Beckman). Para identificação e quantificação usaram-se padrões individuais de cada pigmento. O estado de desepoxidação (DEPS) envolvendo os componentes do ciclo das xantofilas, violaxantina (Viol), anteraxantina (Ant) e zeaxantina (Zea), foi calculado segundo Schindler *et al.* (1994) (DEPS = [(Zea+0.5 Ant)/(Viol+Ant+Zea)]).

3.2.5 Atividade Máxima de Enzimas Antioxidantes do Cloroplasto

3.2.5.1 Cu,Zn- Superóxido Dismutase

Foram utilizadas ca. 4 g de peso fresco de material foliar para o isolamento dos cloroplastos e determinação da Cu,Zn-SOD (EC 1.15.1.11). Após maceração em 20 mL de tampão de extração (20 mM Tricina-KOH (pH 8,0), contendo 0.4 M de Sacarose, 10 mM NaCl e 30 mM Ascorbato de sódio), o homogenato resultante foi filtrado com gaze (8 camadas) e centrifugado (3000 g, 5 min, 4 °C). O depósito contendo os cloroplastos foi ressuspensionado em 10 mL de uma solução tampão 0,1 mM Tris-HCL (pH 8,0) contendo 0,1 mM de EDTA e 0,3 % (v/v) de Triton X-100, e centrifugado (15000 g, 15 min, 4 °C) sendo recolhido o sobrenadante. A atividade máxima da Cu,Zn-SOD nos cloroplastos foi determinada por espectrofotometria (550 nm, 25 °C) de acordo com McCord e Fridovich (1969) e otimizado para *Coffea* spp. (Ramalho *et al.*, 1998). A 50 µL de extrato foi adicionado a 2,9 mL de tampão de reação contendo 10 µM ferricitocromo *c* e 10 µL de xantina oxidase, de forma a produzir uma taxa de redução do ferricitocromo *c* para ca. 0,0225 unidades de absorvância por minuto a 550 nm. Uma unidade de Cu,Zn-SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma inibição de 50% na taxa de redução do citocromo *c*.

3.2.5.2 Ascorbato Peroxidase

A atividade enzimática da APX (EC 1.11.1.11) do cloroplasto foi determinada em extratos de cloroplastos (ca. 3 g de peso fresco foliar), como descrito por Nakano e Asada (1981) e adaptado para *Coffea* spp (Ramalho *et al.*, 1998). O material vegetal foi homogeneizado em 25 mL de uma solução tampão 50 mM HEPES-NaOH (pH 7,6) contendo 0,4 mM de sorbitol, 1 mM EDTA, 2,5 mM de mercaptoetanol e 0,4 % (p/v) de BSA. Após filtragem com gaze (8 camadas) a suspensão foi centrifugada (3000 g, 5 min, 4 °C) sendo o sobrenadante descartado e o depósito com os cloroplastos ressuspenso em 5 mL de uma solução tampão de 25 mM HEPES-NaOH (pH 7,6). A atividade da enzima foi determinada a 25 °C pela adição de 20 µL da amostra a 2,95 mL do tampão de ressuspenso e 10 µL de 0,5 M de ascorbato de sódio. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente pela curva de consumo do peróxido de hidrogênio obtida a 290 nm durante 120 s, usando um coeficiente de absorvidade de 2,8 mM cm⁻¹.

3.2.5.3 Glutathione Redutase

A enzima glutathione redutase (EC 1.6.4.2) foi determinada segundo Ramalho *et al.* (1998). Para obtenção dos cloroplastos usou-se uma amostra de ca. 3-4 g de peso fresco de material vegetal foliar (Foster e Hess, 1980), que foi homogeneizado em 25 mL de uma solução tampão 0,1 M Tris-HCl (pH 6,9), contendo 0,4 mM sacarose, 10 mM ascorbato de sódio e 2% (p/v) PVPP insolúvel). Após filtragem com gaze (8 camadas) e centrifugação (12000 g, 10 min, 4 °C), o depósito obtido foi ressuspenso em 4 mL de uma solução 0,15 M HEPES (pH 8,0) com 1 mL de EDTA e 0,2 % (v/v) de Triton X-100 seguindo-se nova centrifugação (8000 g, 10 min, 4 °C) e sendo recolhido o sobrenadante (Foyer *et al.*, 1994). A atividade da enzima GR foi avaliada segundo Schaedle e Bassham (1977), utilizando 2,5 mL de uma solução de tampão de reação de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 3 mM de MgCl₂, 0,5 mM de GSSG e 0,15 mM de NADPH. Acompanhou-se a reação após a adição de 25 µL de extrato, monitorizando espectrofotometricamente a oxidação de NADPH a 340 nm durante 120 s. Foram utilizadas soluções padrão de NADPH entre 20 e 400 mg mL⁻¹ para estabelecer a curva de calibração.

3.2.6 Avaliação de Moléculas Protetoras não Enzimáticas

3.2.6.1 Quantificação do Ascorbato

Para a quantificação do ascorbato usou-se o método para HPLC descrito por Fortunato *et al.* (2010). Macerou-se ca. 100 mg de peso fresco em 2 mL de uma solução de 3% (p/v) ácido meta-fosfórico e a 8% (v/v) ácido acético glacial. As amostras foram sucessivamente agitadas (15 min), sujeitas a ultrassons (5 min) e centrifugadas (10000 g, 5 min, 4 °C), sendo o sobrenadante obtido filtrado (PVDF, 0,45 µm). A quantificação foi feita pela técnica de HPLC de fase reversa, utilizando uma coluna C18, Spherisorb ODS-2 (250 x 4,6 mm, 5 µm), com colunas guarda do mesmo material e detecção a 254 nm, usando um detetor UV-Vis (mod. 440, Waters Millipore Associates, EUA). A eluição das injeções de 20 µL foi realizada com H₂O a pH 2,2 (conseguida por adição de H₂SO₄) durante 15 min, com um fluxo de 0,4 mL min⁻¹. Uma curva padrão foi utilizada para a quantificação, da concentração de ácido ascórbico.

3.2.6.2 Quantificação da Proteína de Choque Térmico 70 kDa

Para a quantificação da proteína de choque térmico de 70 KDa (HSP70) foi utilizado um teste imunoenzimático (ELISA) em microplacas (Costar, Corning, NY, EUA) como descrito por Martins *et al.* (2016). De forma breve, ca. 100 mg de peso fresco foram homogeneizados em 1mL de tampão 200 mM Tris-HCl (pH 8,0), contendo 20 mM β-mercaptoetanol, 2 mM ditioneitol (DTT), 2% triton X-100, 4% (v/v) “Complete-protease inhibitor cocktail” com EDTA, 10% polyvinylpolypyrrolidone, e 10% glycerol). O homogenato foi seguidamente centrifugado (10000 g, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante foi recolhido. A quantificação de HSP70 foi obtida por comparação com a absorvância de um padrão de referência da HSP70 purificada, usando-se um leitor de microplacas a uma absorvância de 405 nm. O teor de proteínas solúveis totais dos extratos enzimáticos seguiu o método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.2.7 Permeabilidade Membranar e Índice de Dano

O índice de dano membranar foi quantificado segundo o método descrito para o cafeeiro por Scotti-Campos *et al.* (2019). Cada amostra de dez discos foliares (0,5 cm² cada) foi lavada três vezes com água desionizada. Os discos foram então colocados a flutuar em frascos

com 10 mL de água desionizada, tapados e mantidos a uma temperatura de 20 °C. A condutividade iônica de cada frasco foi lida após estabilização (ca. 24 h), com um condutímetro Crison GPL31 (Crison Instruments, S.A., Espanha). Os frascos foram então colocados a 90 °C durante 2 h, para total permeabilização das membranas, deixando-se arrefecer até aos 20 °C antes de ler a condutividade total. A percentagem de dano membranar em cada amostra foi expressa como a percentagem da condutividade total.

3.2.8 Quantificação dos Lípidos Membranares do Cloroplasto

A quantificação dos lípidos membranares da fração cloroplastial foi efectuada como descrito para folhas de cafeeiro (Partelli *et al.*, 2011, Scotti-Campos *et al.*, 2019). Macerou-se ca. 4 g peso fresco de material vegetal foliar em 20 mL de tampão 50 mM MES, (pH 6,4), contendo 0,4 M D-sorbitol, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM MnCl₂, 0,4% (p/v) BSA e 2 mM ascorbato. O homogenato foi então filtrado com gaze (8 camadas) e centrifugado (5000 g, 5 min, 4 °C). Os lípidos totais foram extraídos do depósito obtido utilizando 9 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol/água (1:1:1, v/v/v) de acordo com Allen *et al.* (1966). Após centrifugação (4500 g, 10 min, 4 °C), recolheu-se a fase inferior que contém a totalidade dos lípidos. Estas amostras foram secas por evaporação com fluxo de azoto e novamente ressuspendidas em 0,5 mL de solução de etanol/tolueno (1:4, v/v). Posteriormente, alíquotas de 50 µL do estrato foram saponificadas adicionando-se 4 mL de 0,5 M NaOH em metanol a 65 °C durante 15 min. Antes da metilação, foram adicionados 50 µL por amostra de ácido heptadecanóico (C17:0) como padrão interno, para as determinações quantitativas de ácidos gordos totais (AGT). A metilação consistiu na adição de 2 mL de metanol-BF₃, (trifluoreto de boro em metanol) com aquecimento a 65 °C num período de 15 min segundo o método de Metcalfe *et al.* (1966). Ainda nas mesmas condições, adicionou-se 10 mL de pentano e 2 mL de água destilada, seguindo-se uma agitação rápida. Após um período de decantação (60 min), recolheu-se a fase superior que foi seca com fluxo de azoto em banho-maria (40 °C). As amostras foram ressuspendidas em 300 µL de etanol:tolueno (1:4, v/v) e analisadas por cromatografia gás-líquido (CP3380, Varian, CA, EUA), como descrito em Scotti-Campos *et al.* (2019). Os AG individuais foram identificados por comparação com padrões de cada AG.

3.2.9 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando uma ANOVA de dois fatores, como descrito no Capítulo 2.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Estado de Fotoinibição do PSII

Os valores dos índices de fotoinibição crônica (PI_{Chr}), dinâmica (PI_{Dyn}) e total (PI_{Total}) do PSII não se alteraram significativamente em MWD em CL153 e aCO₂. Já em SWD observaram-se aumentos significativos de 172%, 91%, e 107%, respectivamente (Fig. 3.1). Por seu lado, nas plantas de Icatu em aCO₂ não se verificou qualquer alteração na PI_{Chr} em MWD, nem mesmo SWD, mas observaram-se aumentos significativos de PI_{Dyn} (108%) e PI_{Total} (81%) em MWD, cujos valores que se mantiveram quase inalterados em SWD.

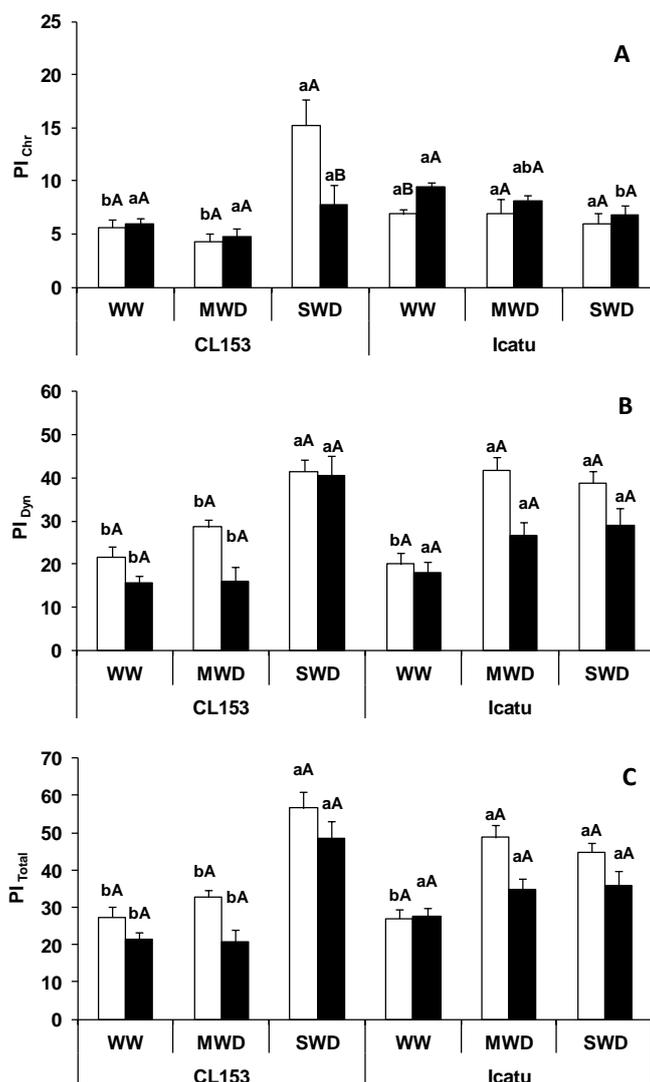


Figura 3.1. Variação dos parâmetros da fluorescência relacionados com o cálculo do estado de fotoinibição, PI_{Chr} (fotoinibição crônica) (A), PI_{Dyn} (fotoinibição dinâmica) (B) e PI_{Total} (fotoinibição total) (C), em *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, cultivadas sob 380 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂ (barra a branco) ou 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂ (barra a preto) e submetidas a três níveis hídricos: conforto hídrico (WW), seca moderada (MWD) e seca severa (SWD). Para cada parâmetro o valor médio \pm SE (n = 5-6) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

Em geral, a presença de eCO₂ não teve impacto nestes índices nas plantas WW (com exceção a PI_{Chr} em Icatu), mas claramente atenuou o impacto da seca nas plantas de CL153. Tal reflectiu-se em reduções de 44% (PI_{Dyn}) e 37% (PI_{Total}) em MWD (embora não significativas) e, especialmente, de 49% no PI_{Chr} em SWD, sempre comparando com o respectivo valor observado em aCO₂. Também em Icatu, o eCO₂ levou a uma tendência sistemática de decréscimo de PI_{Dyn} e PI_{Total} (embora não significativos) em MWD e SWD, embora sem impacto no PI_{Chr} que não havia sido afectado pela seca severa em aCO₂.

3.3.2 Pigmentos Fotossintéticos

Com a imposição de seca (em aCO₂) o teor total de clorofila (*a+b*) diminuiu significativamente nas plantas de CL153 (36%, MWD; 25%, SWD), não sendo afectado em Icatu (Tabela 3.1). Por outro lado, o eCO₂ não afectou o nível de pigmentos nas plantas WW de ambos os génotipos, mas revertou o impacto de SWD nas plantas de CL153.

Os rácios Chl *a/b* e Chl (*a+b*)/carotenóides totais não mostraram alterações significativas entre regimes hídricos, bem como entre as duas concentrações de CO₂ em CL153, mas o valor de Chl *a/b* apresentou uma tendência de decréscimo progressivo com o aumento da severidade da seca nas plantas de Icatu, significativa apenas em aCO₂.

O teor de carotenóides totais (Total Car) mostrou algumas alterações com a disponibilidade hídrica e génotipo, mas não entre [CO₂] (Tabela 3.1). Em ambos os génotipos não se registaram alterações significativas em MWD, independentemente da [CO₂]. Já em SWD as plantas de CL153 não mostraram aumento dos valores de Total Car em cada [CO₂], mas as plantas em eCO₂ apresentaram valores superiores às de aCO₂. Por seu lado, as plantas de Icatu submetidas a SWD mostraram aumentos significativos em aCO₂ (29%) e especialmente em eCO₂ (60%), quando comparados com os respetivos valores em WW, embora sem diferenças entre os tratamentos de CO₂ em cada nível hídrico.

Uma análise mais detalhada dos carotenóides, permitiu identificar alterações na concentração individual de xantofilas e carotenos dependentes dos tratamentos e génotipos (Tabela 3.1). Os teores de neoxantina não variaram significativamente em CL153 face ao défice hídrico dentro de cada tratamento de CO₂, mas em SWD as plantas de eCO₂ apresentaram um valor 42% superior às de aCO₂. Já em Icatu este pigmento aumentou significativamente em SWD e ambas as [CO₂] (face às respectivas plantas WW), mas com um maior aumento em eCO₂, reflectido num valor 23% superior ao das plantas em aCO₂, e sendo o maior valor absoluto deste pigmento em todo o ensaio.

Os pigmentos do ciclo das xantofilas (violaxantina, Viol; anteraxantina, Ant; zeaxantina, Zea) mostraram também variações entre diversos tratamentos. Globalmente,

com a seca, observaram-se decréscimos de Viol (pigmento de captação) e aumentos de Zea (pigmento de dissipação) e no *pool* destas xantofilas (Viol+Ant+Zea), principalmente em Icatu para o *pool*. As alterações foram claras em ambos os genótipos submetidos a SWD e em ambos os tratamentos de [CO₂], com as plantas MWD a apresentarem normalmente valores intermédios entre as plantas WW e SWD. As plantas CL153 em SWD mostraram um aumento de Zea para 5,0 (aCO₂) e 3,6 (eCO₂) vezes relativamente às plantas WW. Em Icatu as plantas SWD atingiram valores 8,4 (aCO₂) e 7,0 (eCO₂) vezes superiores às plantas WW, não diferindo entre tratamentos de [CO₂] em ambos os genótipos. Tal, levou a um aumento gradual do valor de DEPS, sendo significativo em SWD para ambos os genótipos e [CO₂].

Apesar de um comportamento aparentemente semelhante nos dois genótipos, o aumento de Zea em CL153 foi quase exclusivamente suportado pelo *pool* de pigmentos (Viol+Ant+Zea) pré-existente em WW, pois o valor desse *pool* não aumentou significativamente em condições de seca em aCO₂, embora tenha sido reforçado em eCO₂ (ca. 33%) face às plantas WW. Já as plantas de Icatu mostraram forte síntese *de novo* do *pool* destes pigmentos, refletida em aumentos graduais que atingiram acréscimos máximos de 53% (aCO₂) e 100% (eCO₂) em SWD, embora sem diferenças entre [CO₂] em qualquer dos níveis de disponibilidade hídrica.

O carotenoide mais representativo, a xantofila luteína, mostrou igualmente comportamento distinto entre genótipos. Em CL153, apesar de uma tendência para decréscimo em MWD (especialmente em aCO₂), não se observaram diferenças significativas entre as plantas WW e SWD em qualquer das condições de [CO₂]. Em contraste, Icatu manteve os valores em MWD e apresentou aumentos significativos de 30% (aCO₂) e 52% (eCO₂), em SWD, embora sem diferenças entre tratamentos de [CO₂] em qualquer dos níveis de disponibilidade hídrica.

Relativamente aos carotenos, destacaram-se os valores relativamente estáveis de α -caroteno em CL153 independentemente dos tratamentos hídricos e [CO₂], enquanto em Icatu houve um aumento significativo em SWD, sem diferenças significativas entre [CO₂] nos dois genótipos. Por seu lado, o teor de β -caroteno normalmente decresceu com a seca, de forma significativa nas plantas SWD relativamente às WW, em ambos os genótipos e [CO₂]. Contudo, como resultado das variações distintas de α - e β -caroteno, observam-se tendências para o decréscimo do valor de ($\alpha+\beta$) caroteno em CL153 (e manutenção de um maior valor nas plantas de eCO₂), e de manutenção dos valores em Icatu (com exceção em MWD eCO₂). Em ambos os genótipos o rácio (α/β) caroteno aumentou em condições de seca severa em comparação com WW e MWD, de forma similar nos dois genótipos e independentemente da [CO₂].

Tabela 3.1. Variação dos teores dos pigmentos fotossintéticos: clorofila total (a+b), razão clorofila a/b e a razão clorofila total (a+b) / carotenoides totais (medidos espectrofotometricamente), assim como xantofilas e carotenos (medidos por HPLC) em *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, desenvolvidas em condições de CO₂ ambiente (380 µL L⁻¹, aCO₂) ou CO₂ elevado (700 µL L⁻¹, eCO₂) e submetidas a WW, MWD ou SWD. Para cada parâmetro o valor médio ± SE (n = 5) seguido por letras distintas representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

Genótipo		CL153						Icatu					
[CO ₂]	(µL L ⁻¹)	380			700			380			700		
Regime Hídrico		WW	MWD	SWD	WW	MWD	SWD	WW	MWD	SWD	WW	MWD	SWD
Chl (a+b)	(mg g ⁻¹ PS)	10,23±0,42 aA	6,58±0,93 bA	7,63±0,57 bA	10,51±0,86 aA	8,22±0,33 aA	10,59±1,27 aA	9,85±0,43 aA	10,28±0,56 aA	11,20±0,63 aA	10,51±0,68 aA	7,37±0,51 bA	12,27±0,58 aA
Chl (a/b)	(g g ⁻¹)	3,19±0,06 aA	3,38±0,09 aA	3,22±0,10 aA	3,29±0,06 aA	3,21±0,09 aA	3,13±0,04 aA	3,14±0,08 aA	2,99±0,05 abA	2,82±0,05 bA	3,08±0,06 aA	2,97±0,06 aA	2,87±0,05 aA
Chl (a+b)/Total Car	(g g ⁻¹)	4,80±0,10 aA	4,99±0,11 aA	4,70±0,14 aA	4,88±0,11 aA	4,96±0,12 aA	4,92±0,22 aA	4,79±0,08 aA	4,38±0,07 aA	4,78±0,11 aA	4,75±0,07 aA	4,55±0,13 aA	4,76±0,11 aA
Neoxantina	(mg g ⁻¹ PS)	0,243±0,010 aA	0,146±0,020 bA	0,179±0,015 abB	0,243±0,018 aA	0,191±0,011 aA	0,255±0,029 aA	0,214±0,007 bA	0,184±0,025 bA	0,283±0,017 abB	0,218±0,010 bA	0,183±0,016 bA	0,348±0,012 aA
Violaxantina	(mg g ⁻¹ PS)	0,243±0,021 aA	0,139±0,030 abA	0,114±0,024 bA	0,231±0,028 aA	0,162±0,015 aA	0,166±0,040 aA	0,278±0,011 aA	0,105±0,020 bA	0,137±0,016 bA	0,248±0,014 aA	0,193±0,010 aA	0,195±0,023 aA
Zeaxantina	(mg g ⁻¹ PS)	0,047±0,006 bA	0,079±0,014 bA	0,235±0,047 aA	0,083±0,016 bA	0,125±0,036 bA	0,299±0,056 aA	0,048±0,006 cA	0,216±0,045 bA	0,403±0,034 aA	0,044±0,008 bA	0,123±0,059 bA	0,309±0,044 aA
Viol+Ant+Zea	(mg g ⁻¹ PS)	0,347±0,011 aA	0,257±0,024 bA	0,394±0,038 aA	0,347±0,022 bA	0,345±0,041 bA	0,463±0,025 aA	0,360±0,013 bA	0,397±0,039 bA	0,552±0,033 aA	0,308±0,010 bA	0,378±0,074 bA	0,616±0,029 aA
DEPS*		0,246±0,042 bA	0,424±0,074 abA	0,665±0,068 aA	0,252±0,031 bA	0,304±0,041 bA	0,612±0,084 aA	0,181±0,018 bA	0,619±0,058 aA	0,735±0,029 aA	0,183±0,029 bA	0,288±0,090 bB	0,575±0,050 abB
Luteína	(mg g ⁻¹ PS)	0,785±0,033 aA	0,481±0,063 bA	0,631±0,045 abA	0,746±0,043 aA	0,619±0,019 aA	0,773±0,068 aA	0,713±0,025 bA	0,626±0,033 bA	0,928±0,055 aA	0,681±0,029 bA	0,634±0,061 bA	1,033±0,042 aA
α-Caroteno	(mg g ⁻¹ PS)	0,178±0,012 aA	0,176±0,020 aA	0,157±0,013 aA	0,205±0,035 aA	0,132±0,009 aA	0,214±0,030 aA	0,131±0,015 bA	0,092±0,007 bA	0,198±0,019 aA	0,117±0,011 bA	0,077±0,003 bA	0,200±0,023 aA
β-Caroteno	(mg g ⁻¹ PS)	0,190±0,016 aA	0,114±0,003 abA	0,098±0,004 bA	0,224±0,021 aA	0,153±0,008 bA	0,134±0,009 bA	0,206±0,009 bA	0,272±0,031 aA	0,144±0,005 cA	0,200±0,009 aA	0,142±0,009 bB	0,168±0,008 bA
(α+β) Caroteno	(mg g ⁻¹ PS)	0,368±0,024 aA	0,290±0,018 aA	0,254±0,017 aA	0,429±0,052 aA	0,284±0,012 bA	0,348±0,038 aA	0,338±0,032 aA	0,365±0,027 aA	0,342±0,021 aA	0,317±0,017 aA	0,219±0,012 bB	0,368±0,023 aA
(α/β) Caroteno	(g g ⁻¹)	1,15±0,12 bA	1,19±0,12 abA	1,58±0,09 aA	0,894±0,095 bA	0,891±0,081 bA	1,53±0,12 aA	0,627±0,060 bA	0,391±0,069 bA	1,36±0,13 aA	0,590±0,069 bA	0,554±0,032 bA	1,23±0,14 aA
Total Car	(mg g ⁻¹ PS)	1,69±0,04 aA	1,40±0,06 aA	1,54±0,09 abB	1,64±0,09 abA	1,44±0,06 bA	1,89±0,15 aA	1,63±0,04 bA	1,57±0,06 bA	2,10±0,11 aA	1,48±0,04 bA	1,41±0,14 bA	2,37±0,09 aA
(Viol+Ant+Zea)/Total Car	(mg g ⁻¹ PS)	0,199±0,005 bA	0,240±0,010 abA	0,275±0,018 aA	0,212±0,006 bA	0,235±0,021 abA	0,281±0,020 aA	0,221±0,005 bA	0,250±0,018 abA	0,264±0,010 aA	0,209±0,003 bA	0,254±0,025 abA	0,261±0,009 aA

* DEPS (estado desepoxidação) (= [Zea + (0,5 Ant) / (Viol + Ant +Zea)], onde Viol (violaxantina), Ant (anteraxantina) e Zea (zeaxantina).

3.3.3 Enzimas Antioxidativas do Cloroplasto

As enzimas antioxidativas do cloroplasto, superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) mostraram padrões distintos de atividade face às diferentes condições e nos genótipos em estudo.

A atividade da Cu,Zn-SOD aumentou como resposta à imposição do déficit hídrico nos dois genótipos em aCO₂, significativamente apenas em Icatu onde se registaram acréscimos de 252% em MWD e de 267% em SWD, ambos em relação a WW (Fig. 3.2A). O aumento da [CO₂] não teve implicações na atividade da Cu,Zn-SOD nas plantas WW de ambos os genótipos. Contudo, a sobreposição de condições de seca e eCO₂ levaram a atividades tendencialmente superiores nas plantas de CL153 (MWD e SWD) e Icatu (SWD), embora de forma significativa apenas em Icatu (que apresentou igualmente os valores absolutos mais elevados em SWD).

A APX sofreu um aumento moderado e gradual com a imposição do déficit hídrico em aCO₂, tornando-se significativo no regime SWD em ambos os genótipos (43% em CL153 e 31% em Icatu) (Fig. 3.2B). O aumento da [CO₂] promoveu aumentos da atividade de APX nas plantas em conforto hídrico (WW), significativo em CL153 (83%). Em eCO₂ verificou-se aumentos da APX nos dois genótipos e em ambos os níveis de seca, sendo particularmente evidentes no regime MWD com acréscimos máximos de 83% (CL153) e 61% (Icatu) por comparação com as respetivas plantas aCO₂ no mesmo nível de disponibilidade hídrica.

Já a atividade da GR nas plantas submetidas apenas a déficit hídrico, decresceu significativamente em MWD e SWD, respetivamente, 63% e 56% em CL153 e 14% e 24% em Icatu, por comparação com as suas plantas WW em aCO₂ (Fig. 3.2C). O aumento de [CO₂] reduziu a atividade desta enzima nas plantas WW (35% em CL153; 34% em Icatu). Contudo, as plantas em eCO₂ mantiveram níveis estáveis de atividade independentemente do nível de disponibilidade hídrica. Tal como para as duas enzimas anteriores, o Icatu apresenta consistentemente maiores valores absolutos de atividade de GR em seca.

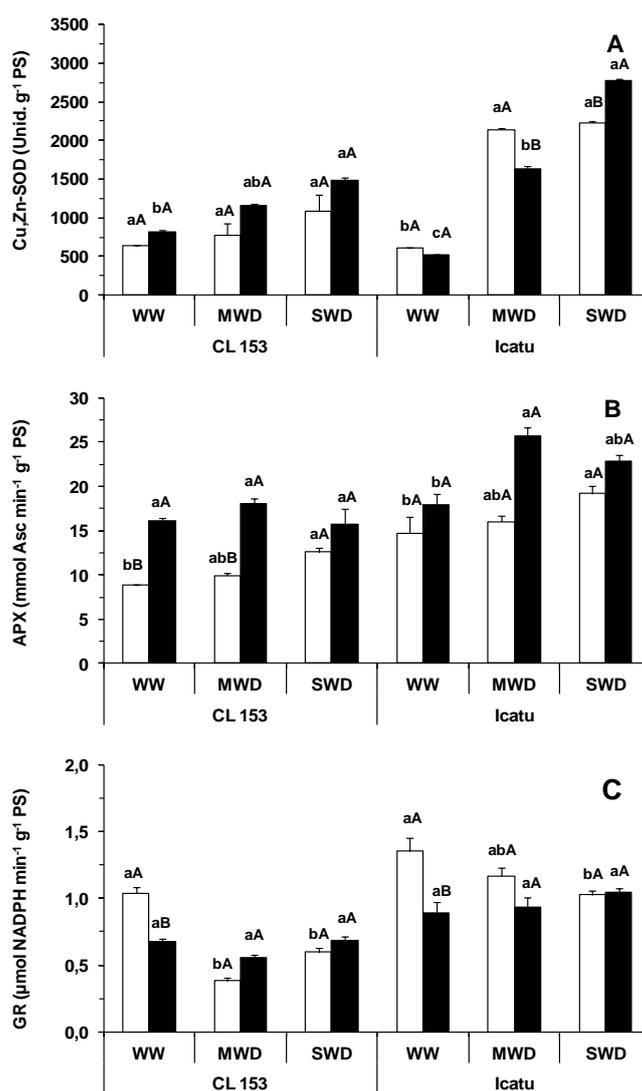


Figura 3.2. Variação na atividade máxima das enzimas antioxidantes, Cu,Zn- superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD) (A), ascorbato peroxidase (APX) (B), glutatona redutase (GR) (C) em *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, cultivadas sob 380 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 (barra a branco) ou 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 (barra a preto) e submetidas a três níveis hídricos: conforto hídrico (WW), seca moderada (MWD) e seca severa (SWD). Para cada parâmetro o valor médio \pm SE (n = 5-6) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma $[\text{CO}_2]$ (a,b,c) ou entre as duas $[\text{CO}_2]$ no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

3.3.4 Moléculas Protetoras Não Enzimáticas

Embora com flutuações, o teor de ascorbato (Asc) não sofreu alterações significativas em ambos os genótipos com a seca em aCO_2 , nem com o aumento da $[\text{CO}_2]$ nas plantas WW (Fig. 3.3A). Contudo, com sobreposição eCO_2 e SWD os teores de Asc foram reforçados nas plantas CL153 (152%), e Icatu (79%), relativamente às suas plantas em aCO_2 .

O teor da proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70) não mostrou variações significativas com a seca e/ou aumento de $[\text{CO}_2]$ nas plantas CL153 (Fig. 3.3B). Pelo

contrário, em Icatu, a seca estimulou o aumento significativo em MWD (128%) que se manteve em SWD. Adicionalmente, apesar de eCO₂ não alterar os valores de HSP70 nas plantas WW, a presença de eCO₂ ampliou a síntese da proteína em MWD (54%) e SWD (43%), relativamente às respectivas plantas aCO₂. Estes valores refletem aumentos de 202% (MWD) e 127% (SWD) relativamente às plantas WW em eCO₂.

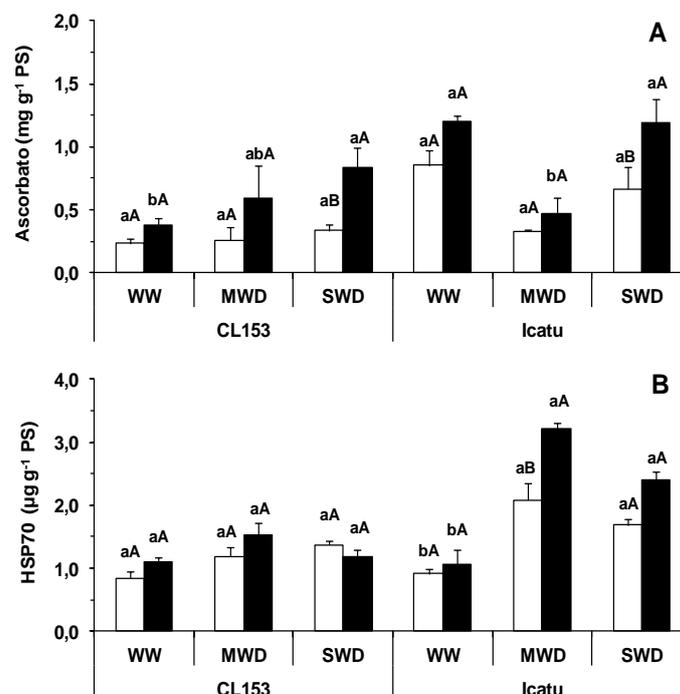


Figura 3.3. Variação nos teores de ascorbato(A) e HSP70 (B) em *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, cultivadas sob 380 μL L⁻¹ de CO₂ (barra a branco) ou 700 μL L⁻¹ de CO₂ (barra a preto) e submetidas a três níveis hídricos: conforto hídrico (WW), seca moderada (MWD) e seca severa (SWD). Para cada parâmetro o valor médio ± SE (n = 5-6) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b,c) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

3.3.5 Impactos na Integridade Membranar

A avaliação de potenciais danos na integridade das membranas celulares através da perda de eletrólitos revelou ausência de alterações do índice de dano (I%) em ambos genótipos nas plantas MWD, independentemente do nível de [CO₂], (Fig.3.4). Contudo, o aumento da severidade do défice hídrico (SWD) aumentou significativamente a perda de eletrólitos em aCO₂ nas plantas de CL153 (132%) e Icatu (107%).

O aumento da [CO₂] não alterou a selectividade membranar nas plantas WW nos dois genótipos, mas reduziu significativamente (42%) o I% nas plantas CL153 em SWD.

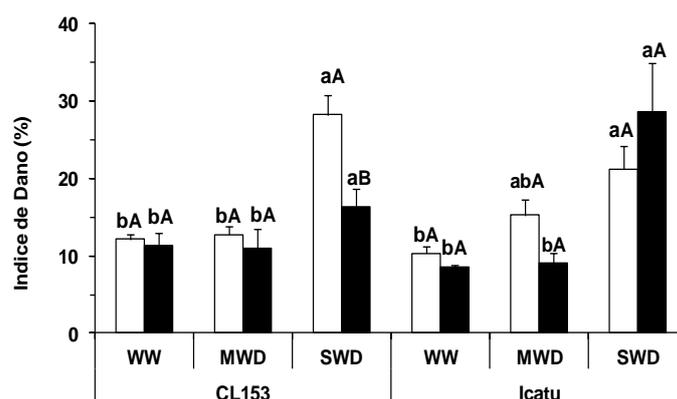


Figura 3.4. Variação no índice de dano membranar (%) em *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, cultivadas sob 380 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 (barra a branco) ou 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 (barra a preto) e submetidas a três níveis hídricos: conforto hídrico (WW), seca moderada (MWD) e seca severa (SWD). Para cada parâmetro o valor médio \pm SE ($n = 4-6$) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma $[\text{CO}_2]$ (a,b,c) ou entre as duas $[\text{CO}_2]$ no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

3.3.6 Análise da Matriz Lipídica das Membranas do Cloroplasto

Em $a\text{CO}_2$ a seca severa não teve impacto nos teores de ácidos gordos totais (AGT) nas plantas CL153, mas em Icatu promoveu um aumento quantitativo significativo de 68% reflectindo forte síntese *de novo* de ácidos gordos (Fig. 3.5A). Adicionalmente, em ambos os genótipos o índice de insaturação (DBI) registou aumentos significativos de 44% e 106% em CL153 e Icatu, respectivamente (Fig. 3.5B), apontando para alterações qualitativas relativas aos ácidos gordos das membranas dos cloroplastos.

Por si só, o aumento de $[\text{CO}_2]$ não alterou os valores de AGT e DBI nas plantas WW de ambos os genótipos. Já em SWD o $e\text{CO}_2$ não promoveu alterações quantitativas uma vez que o valor de AGT não foi alterado em comparação a $a\text{CO}_2$. Contudo o $e\text{CO}_2$ promoveu moderadas alterações qualitativas, reflectidas na diminuição do DBI de 21% em CL153 e 8% em Icatu, significativo apenas para o primeiro, embora ambos os genótipos registem valores similares de AGT e DBI em condições de $e\text{CO}_2$ e SWD.

Uma análise mais detalhada do peso relativo dos ácidos gordos individuais das membranas cloroplastidiais, permitiu observar uma maior abundância relativa do ác. linolénico (C18:3), seguido do ác. palmítico (C16:0), em ambos os genótipos e qualquer das condições estudadas, embora a representatividade do C18:3 seja algo superior em CL153 (Tabela 3.2). Contudo, diversas alterações foram observadas nos diferentes tratamentos.

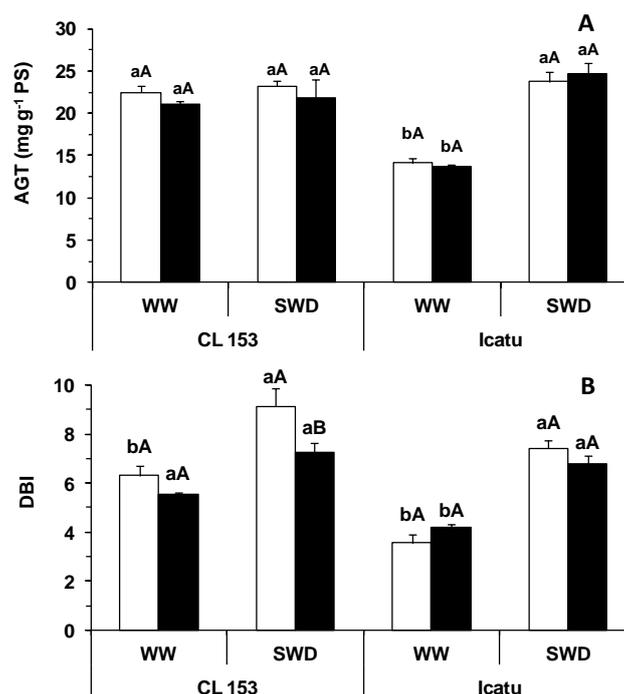


Figura 3.5. Variação no teor dos ácidos gordos totais (AGT) (A) e do grau de insaturação (DBI) (B), dos lípidos membranares do cloroplasto em folhas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, cultivadas sob 380 µL L⁻¹ de CO₂ (barra a branco) ou 700 µL L⁻¹ de CO₂ (barra a preto) e submetidas a dois níveis hídricos: conforto hídrico (WW) e seca severa (SWD). Para cada parâmetro o valor médio ± SE (n = 3) é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma [CO₂] (a,b) ou entre as duas [CO₂] no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

A imposição de SWD levou principalmente ao aumento da proporção de C18:3 e reduções de C16:0, C18:0 e C18:2 em CL153, enquanto em Icatu se destacam o forte aumento de C18:3 e a redução de C16:0 e C18:2, que levaram ao aumento do DBI. Dos restantes AGs destaca-se o C16:1c+t, o qual mostrou em Icatu uma tendência de aumento (30%) associado à imposição de seca em aCO₂.

Apesar da manutenção de DBI nas plantas WW de ambos os genótipos, o aumento da [CO₂] promoveu algumas variações significativas de AGs em CL153 (decréscimo de C18:3 e C18:0; aumento de C18:2 e de ác. oleico, C18:1), e um aumento de 83% de ác. hexadecenóico (C16:1c+t) em Icatu (cujo valor aumentado se manteve em SWD).

A presença de eCO₂ nas plantas CL153 submetidas a SWD levou a um decréscimo de C18:3 (significativo) e tendências de aumento de C16:0 e C16:1 c+t, por comparação a aCO₂, em linha com a observada redução de DBI nestas plantas. Nas plantas de Icatu em SWD não se observou um impacto evidente de eCO₂ face a aCO₂, uma vez que não se registaram diferenças significativas entre os níveis de [CO₂] para qualquer dos AGs.

Tabela 3.2. Variação das proporções (mole %) dos ácidos, palmítico (C16:0), hexadecenóico (C16:1 c+t), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), e linolénico (C18:3) de lípidos dos cloroplastos de folhas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, cultivadas sob 380 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 ou 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 e submetidas a conforto hídrico (WW) e seca severa (SWD). Para cada parâmetro o valor médio \pm SE (n = 3 é seguido por letras distintas que representam diferenças significativas entre os regimes hídricos na mesma $[\text{CO}_2]$ (a,b) ou entre as duas $[\text{CO}_2]$ no mesmo regime hídrico (A,B), distintamente para cada genótipo.

Variação das porções dos Ácidos Gordos (mol %)	CL153				Icatu			
	380		700		380		700	
	WW	SWD	WW	SWD	WW	SWD	WW	SWD
C16:0	22,4 \pm 1,2 aA	18,1 \pm 1,4 aA	26,0 \pm 0,1 aA	22,3 \pm 1,1 aA	33,9 \pm 1,2 aA	21,8 \pm 0,9 bA	30,1 \pm 1,3 aA	20,9 \pm 0,3 bA
C16:1 c+t	3,3 \pm 0,5 aA	2,8 \pm 0,1 aA	2,1 \pm 0,2 aA	3,2 \pm 0,2 aA	2,4 \pm 0,3 aB	3,1 \pm 0,0 aA	4,4 \pm 0,4 aA	4,4 \pm 0,3 aA
C18:0	7,6 \pm 0,3 aA	5,3 \pm 0,1 bA	6,2 \pm 0,2 aB	5,2 \pm 0,0 bA	8,3 \pm 1,0 aA	5,2 \pm 0,1 aA	7,8 \pm 0,6 aA	7,5 \pm 0,7 aA
C18:1	1,8 \pm 0,0 bB	2,2 \pm 0,1 aA	2,3 \pm 0,0 aA	2,2 \pm 0,2 aA	2,4 \pm 0,2 aA	2,1 \pm 0,0 aA	2,2 \pm 0,2 aA	2,1 \pm 0,1 aA
C18:2	11,4 \pm 0,2 aB	8,4 \pm 1,3 aA	15,0 \pm 0,4 aA	9,0 \pm 0,4 bA	14,9 \pm 0,9 aA	9,1 \pm 0,1 bA	13,8 \pm 0,8 aA	10,0 \pm 0,1 bA
C18:3	53,4 \pm 1,4 bA	63,2 \pm 0,4 aA	48,4 \pm 0,7 bB	58,1 \pm 1,0 aB	38,2 \pm 3,1 bA	58,7 \pm 0,8 aA	41,8 \pm 0,0 bA	55,1 \pm 1,2 aA

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Impacto do Défice Hídrico e do eCO₂ no Funcionamento do PSII

A maioria dos trabalhos na área das alterações climáticas e o seu impacto nas culturas tropicais tendem a considerar os efeitos dos fatores ambientais isoladamente, sendo escassos os que têm em conta o efeito simultâneo de diferentes limitações ambientais (Zinta *et al.*, 2014, 2018, Smedo *et al.*, 2018, Ramalho *et al.*, 2018b, Abo Gamar *et al.*, 2019, Dubberstein *et al.* 2020). Adicionalmente, o aumento da $[\text{CO}_2]$ atmosférica poderá alterar a capacidade de resposta das plantas, nomeadamente do processo de assimilação do carbono, mitigando ou anulando os impactos negativos das temperaturas elevadas (Martins *et al.*, 2014, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016) e da seca em café (DaMatta *et al.*, 2019, Avila *et al.*, 2020a,b) ou noutras espécies, como *Arabidopsis* (Abo Gamar *et al.*, 2019). De facto, em adição à resiliência intrínseca ao calor (Dubberstein *et al.* 2020) e ao défice hídrico (Smedo *et al.*, 2021), as plantas de CL153 e Icatu mostraram maior tolerância ao calor (Rodrigues *et al.*, 2016) e à SWD (Smedo *et al.*, 2021) quando em eCO₂. Em concordância, observou-se uma significativa redução de PI_{Chr} nas plantas em CL153 em SWD quando desenvolvidas em eCO₂ para níveis semelhantes às plantas WW (Fig. 4.1), enquanto Icatu mostra ausência de alteração deste parâmetro mesmo em aCO₂, em linha com a maior resiliência da sua maquinaria fotossintética e preservação da atividade do PSII em níveis extremos de seca independentemente da $[\text{CO}_2]$ (Smedo *et al.*, 2021).

O aumento da PI_{Chr} deve-se fundamentalmente ao desequilíbrio entre os danos provocados pelo excesso de energia luminosa no PSII e a recuperação desse dano (Murata *et al.*, 2007, Nishiyama e Murata, 2014), quando os diferentes mecanismos de fotoproteção (dissipação de energia) e controlo de ROS são insuficientes (Martins *et al.*, 2016, Ramalho *et al.*, 2018a). Desta forma, menor nível de fotoinibição do PSII nas plantas CL153-SWD em eCO₂ está em linha com o menor impacto na eficiência fotoquímica máxima (F_v/F_m) e à luz (F_v'/F_m') do PSII (Semedo *et al.*, 2021). Contudo, merece destaque que nem mesmo em SWD e ambas as [CO₂] ocorreu um aumento da desregulação dos processos de dissipação de energia associados a danos fotoinibitórios ($Y_{(NO)}$), em linha com a quase ausência de alterações ao nível do teor de clorofilas (e seu rácio), contrariamente ao frequentemente reportado em plantas de outras espécies em défice hídrico (Ghassemi *et al.*, 2019, Buezo *et al.*, 2019).

Adicionalmente, o aumento gradual da PI_{Dyn} (e PI_{Total}) com o aumento de severidade da seca nos dois genótipos, reflecte o aumento dos processos regulados de dissipação de energia ($Y_{(NPQ)}$), embora tendencialmente menores em eCO₂ em Icatu face à manutenção da capacidade de uso de fotoquímica energia ($Y_{(II)}$) (Semedo *et al.*, 2021). De facto, o PI_{Dyn} está associado à atuação de mecanismos de fotoproteção, nomeadamente de pigmentos responsáveis pela dissipação térmica de energia através do ciclo das xantofilas (Demmig-Adams *et al.*, 1996, Giossi *et al.*, 2020, Dumanović, *et al.*, 2021).

3.4.2 Dinâmica dos Pigmentos Fotossintéticos

O aumento do teor de pigmentos fotoprotetores, com destaque para a zeaxantina e luteína é um importante componente da resposta do cafeeiro a stresses ambientais (Ramalho *et al.*, 2000, 2003, Partelli *et al.*, 2009, Batista-Santos *et al.*, 2011). Neste contexto, as plantas de CL153 mostraram uma resposta mais limitada à seca, desde logo devido à ausência global de aumento dos carotenóides totais (Tabela 3.1). De facto, e apesar do valor de Zea (e DEPS) aumentar em SWD em ambas as [CO₂], tal foi conseguido principalmente pela transformação do *pool* pré-existente de pigmentos do ciclo das xantofilas (Viol+Ant+Zea), que aumentou apenas em SWD com eCO₂. Por outro lado, Icatu apresentou aumentos significativos de carotenóides totais em SWD e ambas [CO₂], quando o uso de energia por processos fotoquímicos e a fotossíntese líquida estavam já fortemente reduzidos (Semedo *et al.*, 2021). Tal está em linha com a resposta de aclimação a outros stresses, nomeadamente de baixa e alta temperatura (Batista-Santos *et al.*, 2011, Martins *et al.*, 2016), em que que *C. arabica* mostrou uma resposta mais evidente relacionada com o reforço de pigmentos de fotoproteção do que *C. canephora*. Este aumento nas plantas SWD

resultou em Icatu no reforço significativo de neoxantina (maior em eCO₂), luteína, α -caroteno e Zea (também em MWD e aCO₂). De forma notável, a síntese de Zea (e o aumento de DEPS) contou não só com a conversão a partir de Viol pré-existente, mas também com uma significativa síntese *de novo* do *pool* de pigmentos do ciclo das xantofilas, com particular relevo em eCO₂ onde o valor que duplicou nas plantas em SWD. Esta resposta refletirá uma maior capacidade de fotoproteção, em linha com o forte aumento dos mecanismos de fotoproteção refletidos no aumento de $Y_{(NPQ)}$ e na ausência de processos desregulados de dissipação, já que $Y_{(NO)}$ (Semedo *et al.*, 2021) ou PI_{Chr} (Fig. 3.1) não aumentaram em Icatu.

De facto, face à redução do uso fotoquímico de energia, promovido pelo forte fecho estomático, adequados níveis destes pigmentos nos LHCs e centros de reação impedem a produção de ROS e promovem a sua remoção, e estabilizam essas estruturas (Havaux e Niyogi, 1999). O aumento do gradiente transtilacoidal de H⁺ terá desencadeado a síntese, nomeadamente, de Zea, que aliado ao aumento da proteína PsbS em Icatu (Semedo *et al.*, 2021), promovem o aumento da dissipação térmica de energia (Logan, 2005, Niyogi *et al.*, 2005, Ruban, 2016). A Zea desexcita o ¹O₂ e reduz a formação de moléculas altamente reactivas de Chl (³Chl* e ¹Chl*), protegendo os complexos antena (LHCs) e os componentes da fase lipídica das membranas tilacoidais contra a foto-oxidação (Havaux e Niyogi, 1999, Adams *et al.*, 2002, Lichtenthaler e Babani, 2004, Dall'Osto *et al.*, 2012).

Tal como observado em Icatu em condições de frio (Batista-Santos *et al.*, 2011), os teores de luteína e neoxantina também aumentaram em SWD, principalmente em eCO₂. Este facto, terá contribuído para preservar as antenas uma vez que estes pigmentos são componentes integrais das LHC periféricas, sendo determinantes para a sua montagem em estruturas triméricas, estabilidade e eficiência (Havaux e Niyogi, 1999, Kalituho *et al.*, 2007, Matsubara *et al.*, 2008). Adicionalmente em condições de SWD, a luteína complementarará a função da Zea através de um ciclo paralelo ao das xantofilas (Matsubara *et al.*, 2008), promovendo a remoção do excesso de energia nos LHC, nomeadamente através da desexcitação de ³Chl* e ¹O₂ que são iniciadores de lipoperoxidação, reduzindo assim o dano foto-oxidativo (Adams *et al.*, 2002, Kalituho *et al.*, 2007). Este aumento de luteína nas plantas Icatu em SWD (ambos as [CO₂]) está ainda em linha com o aumento de α -caroteno que é seu precursor, para além do seu papel como antioxidante (Niu *et al.*, 2020).

Por outro lado, o valor total de carotenos ($\alpha+\beta$) não diminuiu significativamente em SWD em resultado da manutenção (CL153) ou do significativo reforço (Icatu) de α -caroteno, já que o β -caroteno sofreu fortes reduções com a seca. O β -caroteno remove ³Chl* e ¹O₂, protegendo os fotossistemas (De Las Rivas *et al.*, 1993, Faraloni e Torzillo, 2017), reforçando e estabilidade e fotoproteção dos PSs do cafeeiro submetido a baixa temperatura

(Ramalho *et al.*, 2003) e irradiância excessiva (Ramalho *et al.*, 2000). Assim, o seu decréscimo em ambos os genótipos, SWD e [CO₂] poderia indicar problemas ao nível da atividade dos fotossistemas. Contudo, associado a reduções significativas dos transportadores tilacoidais de eletrões (*Cit b₅₅₉*, *Cit f* e *Cit b₅₆₃*), tal impacto foi observado apenas nas plantas SWD de CL153 em aCO₂ (Semedo *et al.*, 2021), que registaram o menor valor absoluto de β -caroteno entre todos os tratamentos. Tal sugere que com a redução em cerca de 50% de β -caroteno nestas plantas, foi ultrapassado um limiar mínimo que não foi compensado com outros mecanismos de proteção, mesmo considerando que o aumento de Zea é suportado a partir de β -caroteno (Niu *et al.*, 2020).

3.4.3 Outros Componentes Protetores

A proteção das estruturas fotossintéticas de formas excitadas de Chl e O₂, é frequentemente complementada por um conjunto de componentes de natureza enzimática e não enzimática com capacidade de remoção de ROS (O₂^{•-}, H₂O₂, OH[•], ¹O₂) (Asada, 2006, Bhattacharjee, 2010, Martins *et al.*, 2016, Farooq *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2020). Em linha com resultados reportados em *Coffea* sp. (Ramalho *et al.*, 2018a), Icatu mostrou maior aumento da actividade Cu,Zn-SOD à seca desde MWD, enquanto que eCO₂ ampliou a resposta em SWD (Fig. 3.2A), reforçando a capacidade de remoção de O₂^{•-} quando o uso fotoquímico de energia estava drasticamente reduzido (Semedo *et al.*, 2021) o que aumenta a probabilidade de fluxo de eletrões para o oxigénio molecular e formação de O₂^{•-} (Silva *et al.*, 2010).

Contudo, o H₂O₂ gerado pela actuação da Cu,Zn-SOD deve ser prontamente removido pois, para além de ter capacidade oxidativa, pode gerar OH[•], via reação espontânea de Haber-Weiss (ou diretamente da ³Chl*), que por sua vez pode causar lipoperoxidação, inativação dos PSs e do transporte tilacoidal de electrões, e ainda a degradação de pigmentos, proteínas (*e.g.*, D1) e DNA (Asada, 1994, Cobbett e Goldsbrough, 2002, Foyer, 2002, Logan, 2005). A remoção de H₂O₂ (com produção de H₂O) pode ser efetuada pela catalase e pela APX, a última em conjunto com o ascorbato, que é posteriormente regenerado no ciclo do ascorbato-glutationa, envolvendo nomeadamente GSH (regenerado pela GR) e Zea (Logan, 2005, Smirnov, 2005). De facto, a seca promoveu o aumento da atividade da APX em ambos os genótipos (Fig. 3.2B), tal como anteriormente reportado no cafeeiro (Ramalho *et al.*, 2018a), que assim actuou em conjunto com a fotoproteção promovida por pigmentos como a Zea e a Luteína para minorar os impactos observados ao nível dos PSs (Semedo *et al.*, 2021). Adicionalmente, a eCO₂ promoveu um acentuado reforço na atividade da APX em seca em ambos os genótipos, acompanhado da tendência

de aumento de Asc (Fig. 3.3A), o que terá ajudado a aumentar a atividade da APX, já que é o substrato dessa enzima. Por outro lado, esse aumento de Asc terá ajudado a sustentar a produção de Zea, pois é usado pela violaxantina desepoxidase (VDE) para formar Zea a partir de Viol (Logan, 2005, Smirnoff, 2005). Em sentido contrário, destacou-se o decréscimo de atividade de GR em qualquer dos níveis de seca ou em eCO₂ (nas plantas WW) nos dois genótipos, embora se tenha mostrado insensível à seca em condições de eCO₂ (Fig. 3.2C). Adicionalmente, não se deve descartar o contributo de outras moléculas de proteção, como aquaporinas (Avila et al., 2020b) ou antioxidantes como o ácido 5-O-cafeeoil quinico (5-CQA) (Catarino et al., 2021), cujo aumento pode ser promovido pelo eCO₂ em folhas de cafeeiros em seca severa. De facto, o 5-CQA remove eficientemente radicais livres (e.g., O₂[•]), actuando particularmente contra a lipoperoxidação (Mondolot et al., 2006) e protegendo a maquinaria fotossintética contra a fotoinibição induzida stresses ambientais como o frio (Grace et al., 1998), incluindo em Icatu (Fortunato et al., 2010).

Nos mecanismos de resposta aos stresses ambientais incluem-se também as HSPs (Wang et al., 2004), nomeadamente, a limitações térmicas e hídricas (Tang et al., 2016, Martins et al., 2016, Kumar et al., 2018). A HSP70 previne a desnaturação e agregação de proteínas, preservando a estrutura funcional das mesmas, podendo ainda facilitar a translocação e degradação de proteínas instáveis (Wang et al., 2004, Fragkostefanakis et al., 2015). Embora o *pool* de HSP70 possa aumentar com eCO₂ em *C. canephora* (CL153) (Martins et al., 2016), tal não sucedeu aqui em qualquer dos genótipos, tal como observado em plantas de arroz (Bokhari et al., 2007). Contudo, a resposta à seca e à interação desta com eCO₂ mostrou-se dependente do genótipo, pois enquanto em CL153 o conteúdo de HSP70 não se altera, em Icatu observou-se uma clara resposta à seca (MWD e SWD), e a sua ampliação na interação com eCO₂ (Fig. 3.3B). Este resultado é concordante com a maior capacidade de resposta em Icatu do que em CL153 no que respeita ao *pool* de HSP70 observada para temperaturas supra-ótimas (até 42 °C) e eCO₂ (a 37 °C) (Martins et al., 2016), e a sua resiliência intrínseca ao calor (Rodrigues et al., 2016, Dubberstein et al., 2020) frequentemente reforçada em eCO₂ (Martins et al. 2016, Semedo et al., 2021).

Assim, no seu conjunto, os resultados relativos de mecanismos de proteção *sensu lato* são concordantes com a maior capacidade de resposta em Icatu do que em CL153 (em aCO₂), mas também do papel que o eCO₂ tem no reforço de alguns desses mecanismos, contribuindo para a ausência de impactos significativos ao nível dos PSs em eCO₂ em ambos os genótipos, *i.e.*, o papel que eCO₂ tem no aumento da resiliência ao défice hídrico severo (Ávila et al., 2020a,b, Semedo et al., 2021), o que estará também intimamente ligado à preservação das estruturas membranares.

3.4.4 Integridade Membranar e Alterações Lipídicas do Cloroplasto

Para além de serem alvos primários dos stresses ambientais, as membranas são igualmente os locais onde os estímulos ambientais são detetados, levando a respostas de aclimação (Osakabe *et al.*, 2013, Ruelland *et al.*, 2015, Hou *et al.*, 2016, Niu e Xiang, 2018). Os impactos de stresses ambientais na integridade e seletividade membranar das células vegetais podem ser avaliados através da perda de eletrólitos (I%) (Campos *et al.*, 2003, Demidchik *et al.*, 2014), cujo aumento reflete alterações na compartimentação celular (Scotti-Campos *et al.*, 2019), com repercussões no funcionamento metabólico. Nesse contexto, não se verificou uma alteração na integridade membranar em qualquer dos genótipos com seca moderada (MWD), independentemente da [CO₂] (Fig.3.4), o que está de acordo a ausência de efeitos a outros níveis, nomeadamente no desempenho fotossintético potencial (*e.g.*, A_{max}) e nos fotossistemas (Ramalho *et al.*, 2018a, Semedo *et al.*, 2021). Com uma maior severidade do défice hídrico, as plantas CL153 mostraram um aumento de I% em aCO₂ mas não em eCO₂. Tal está em linha com o aumento de PI_{chr} (Fig. 3.1) e os impactos negativos de processos ligados às membranas dos cloroplastos (*e.g.* transporte e transportadores tilacoidais de eletrões) observados em aCO₂, assim como à redução (ou mesmo reversão) desses impactos em eCO₂ (Semedo *et al.*, 2021). Como visto anteriormente, o atenuar do efeito da seca em eCO₂ estará associado aos moderados, mas sistemáticos aumentos de algumas moléculas protetoras em eCO₂ por comparação a aCO₂ (Zea, Luteína, carotenos, Cu,Zn-SOD, APX, GR, Asc), aliado à manutenção de um maior potencial de uso fotoquímico de energia ($Y_{(II)}$, F_v/F_m) (Semedo *et al.*, 2021), igualmente observado em cafeeiros submetidos a temperaturas supra-óptimas (Martins *et al.*, 2016, Rodrigues *et al.*, 2016).

Por outro lado, em Icatu o significativo aumento de perda de eletrólitos em SWD para ambas as [CO₂], contrasta com a clara resiliência da maquinaria fotossintética nessas condições hídricas e ambas as [CO₂] (embora reforçada em eCO₂) (Semedo *et al.*, 2021). Um padrão semelhante de aumento de I% foi anteriormente observado neste genótipo quando submetido a temperaturas altas (37 e 42 °C), principalmente nas plantas eCO₂ (Scotti-Campos *et al.*, 2019), embora essas plantas tenham mostrado uma clara manutenção do desempenho fotossintético a 37 °C (independentemente da [CO₂]) e uma maior resiliência nas plantas eCO₂ que nas aCO₂ a 42 °C (Rodrigues *et al.*, 2016). Assim, o aumento de permeabilidade, ao invés de refletir dano poderá estar associado à significativa remodelação das membranas (nomeadamente dos cloroplastos), refletida nas alterações quantitativas (aumento de AGT) e qualitativas (proporção das classes lipídicas e nível de

saturação dos AGs) promovidas pelo calor, eCO₂ e, principalmente, a sua interação (Scotti-Campos *et al.*, 2019). Esta interpretação está em concordância com os atuais resultados, uma vez que ambos os genótipos mostraram uma apreciável dinâmica qualitativa relativamente aos seus AGs (e correspondente alteração de DBI), em resposta ao SWD, reforçado apenas em Icatu com forte síntese *de novo*, similar para ambas [CO₂]. De facto, noutras espécies, a alteração da composição lipídica e a modulação da fluidez das membranas dos cloroplastos, através de síntese *de novo* e/ou alteração dos AGs pré-existentes, é um mecanismo crucial para a manutenção do funcionamento fotossintético (Yu e Li, 2014, Barnes *et al.* 2016, Niu e Xiang, 2018), e dos processos de aclimação, nomeadamente, ao frio (Wang *et al.*, 2006, Tovuu *et al.*, 2013), calor (Higashi *et al.*, 2015) e seca (Torres-Franklin *et al.*, 2007, Perlikowski *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2019). Embora não haja informação relativamente à seca, a remodelação qualitativa da matriz lipídica é também parte essencial da resposta de aclimação do cafeeiro (plantas “tipo C18:3”) a temperaturas extremas (Campos *et al.*, 2003, Partelli *et al.*, 2011, Scotti-Campos *et al.*, 2014, 2019) e elevada irradiância (Ramalho *et al.*, 1998).

O forte aumento do DBI promovido pela SWD em ambos os genótipos e [CO₂] deveu-se em larga medida, à alteração da abundância relativa do C18:3 (aumentou) e C16:0 (diminuiu) (Tabela 3.2), que são os dois AGs mais representados na matriz lipídica do cloroplasto (Wang, *et al.*, 2010). Esse aumento de C18:3 está em linha com trabalhos que relacionam o aumento da sua via biosintética em arroz (Lenka *et al.*, 2011), e do seu teor em folhas ou raízes de tabaco, trigo e sobreiro (Shi *et al.*, 2018, Kang *et al.*, 2019, Sebastiana *et al.*, 2019) com a tolerância à seca ou à combinação de vários stresses (seca, frio, salinidade). Em contraste, foram reportados danos associados à seca em genótipos que apresentam decréscimo de C18:3 (Lenka *et al.*, 2011). Acresce que o aumento de insaturação da matriz lipídica cloroplastidial favorecerá uma maior fluidez das membranas, preservando a capacidade de movimento dos lípidos acilo nas membranas tilacoidais (Harwood, 1998, Siegenthaler e Tremolieres, 1998), a integração da proteína D1 sintetizada *de novo* (Kern e Zouni, 2009) e a manutenção do desempenho fotossintético em condições de seca (Xin e Browse, 2000, Gigon *at al.*, 2004, Perlikowski, *et al.*, 2016), como observado em Icatu (e CL153 em eCO₂).

Paradoxalmente, esta dinâmica da matriz lipídica, das membranas dos cloroplastos, ao promover o enriquecimento em AGs polinsaturados, aumentará também o risco de lipoperoxidação, já que as duplas ligações são o substrato preferencial das ROS (Ferrari-Iliou *et al.*, 1993, Scotti-Campos *et al.* 2016, 2019). Neste contexto, para uma efetiva aclimação será imprescindível uma resposta integrada que conte igualmente com o

reforço de mecanismos que evitem a produção ou promovam a remoção de ROS, como observado relativamente a xantofilas e enzimas antioxidativas. Tal foi particularmente evidente em Icatu e eCO₂, à semelhança de respostas do cafeeiro (principalmente genótipos de *C. arabica*) ao calor (Martins *et al.*, 2016, Scotti-Campos *et al.*, 2019), frio (Fortunato *et al.*, 2010, Partelli *et al.*, 2011, Scotti-campos *et al.*, 2014) e alta irradiância (Ramalho *et al.*, 1998, 2000), tornando evidente que a conjugação destes mecanismos é transversal na resposta do cafeeiro a diversas condições ambientais limitantes. Estes resultados estão em linha com a correlação entre o reforço do sistema antioxidativo (em especial SOD) e o aumento de C18:3 e de DBI em plantas de tabaco, que resultaram na tolerância a condições de seca, frio e salinidade (Shi *et al.*, 2018). Para além disso, deve considerar-se que as apenas plantas de Icatu em seca mostraram aumento de abundância de um importante conjunto de proteínas associadas com a maquinaria fotossintética (PSs, LHCs, CEF, RuBisCO activase) independentemente da [CO₂] (Semedo *et al.*, 2021). Desta forma, também o impacto ao nível da maquinaria fotossintética nas plantas de CL153, em aCO₂ pode ser explicado pela menor dinâmica lipídica e uma resposta antioxidativa mais limitada, tal como anteriormente observado noutros genótipos de *C. canephora* em relação a outros stresses, mas também de uma menor síntese de proteínas associadas á (reparação da) maquinaria fotossintética.

O fosfatidil glicerol (PG) é a mais abundante classe de fosfolípidos nas membranas dos cloroplastos, contando em exclusivo com o AG, hexadecenoico (C16:1*t*) (Boudière *et al.*, 2014). Ao PG e C16:1*t* foram associados a um maior desempenho do PSII em plantas sobreiro submetidas à seca (Sebastiana *et al.*, 2019) e à estabilidade das membranas do cloroplasto em *Coffea* spp. em condições de baixa temperatura positiva (Partelli *et al.*, 2011, Scotti-Campos *et al.*, 2014) e calor (Scotti-Campos *et al.*, 2019). De facto, ao C16:1*t* tem sido atribuído um papel chave na estabilização e funcionamento das estruturas fotossintéticas (Siegenthaler e Trémolières, 1998), pois promove a organização da LHCII ao induzir a trimerização dos complexos antena necessários à formação dos grana e à transição entre os estados 1 e 2 (Vijayan *et al.*, 1998, Dubertret *et al.*, 2002). Está ainda associado ao processo de substituição da proteína D1 danificada em condições de excesso de energia e frio (Horváth *et al.*, 1987, Siegenthaler e Trémolières, 1998, Harwood, 1998, Iba, 2002, Gray *et al.*, 2005) o que reduz a fotoinibição do PSII e leva a maior celeridade na recuperação do estado fotoinibido (Gombos e Murata, 1998, Siegenthaler e Trémolières, 1998). Desta forma, o aumento de representatividade de C16:1*c+t* nas plantas WW de Icatu em eCO₂ (resposta à [CO₂]) poderá ter ajudado a suportar um maior aumento de P_n em Icatu (56%) do que em CL153 (37%) (Semedo *et al.*, 2021). Adicionalmente, os valores

tendencialmente superiores de C16:1c+t nas plantas de aCO₂ submetidas a SWD (resposta à seca), conjugado com o forte aumento quantitativo de AGTs (e portanto de C16:1c+t) em SWD, são concordantes com a ausência de aumento de fotoinibição crónica (Fig. 3.1), os reduzidos impactos nos PSs, e o melhor desempenho global da maquinaria fotossintética em Icatu em condição de SWD independentemente da [CO₂] (Semedo *et al.*, 2021). A recuperação de funcionalidade fotossintética nas plantas de CL153 em eCO₂ quando submetidas a SWD é igualmente consistente com o aumento moderado de C16:1c+t nessas plantas (face às respetivas plantas WW).

3.5 CONCLUSÕES

A seca moderada *per se* não causou impactos relevantes em ambos os genótipos e para as duas [CO₂], como refletido na ausência de aumentos nos índices de fotoinibição do PSII e de dano das membranas, assim como no desempenho fotoquímico destas plantas (Semedo *et al.*, 2021). Já a seca severa (em aCO₂) provocou impactos negativos em CL153 mas não em Icatu.

Esta tolerância intrínseca de Icatu à SWD estará associada a um controlo oxidativo mais eficiente, reflectido nos aumentos da síntese de carotenóides fotoprotetores e moléculas antioxidativas (Zea, Luteína, Viol+Ant+Zea, Cu,Zn-SOD, APX), à maior abundância de HSP70, e de uma maior dinâmica da matriz lipídica das membranas dos cloroplastos e maior síntese *de novo* de AGs (tal como do “pool” de xantofilas) aliada a alterações qualitativas (maior insaturação).

O impacto de eCO₂ nas plantas WW promoveu poucas alterações face às plantas em aCO₂. Entre as exceções, contaram-se o aumento de atividade da APX e decréscimo de GR (ambos os genótipos) e um aumento de C16:1c+t em Icatu, que poderá contribuir para suportar a maior atividade fotossintética destas plantas. Contudo, a presença de eCO₂ atenuou os impactos da SWD em CL153 (Icatu não havia sido afectado), refletindo-se na clara redução da fotoinibição crónica e do índice de dano membranar, ligado aos aumentos sistemáticos (embora frequentemente não significativos) do nível de carotenóides (significativo para a neoxantina), das enzimas antioxidativas, Asc, e menor alteração do DBI (logo menos sensível a processos de lipoperoxidação) e dos principais AGs (C18:3 e C16:0). Nas plantas Icatu em SWD o eCO₂ levou ainda assim ao reforço de componentes antioxidativos (Cu,Zn-SOD, APX, Asc) e de proteção (HSP70), enquanto manteve os níveis reforçados de carotenóides, atividade de GR, síntese *de novo* e insaturação dos AGs promovidas pela SWD já em aCO₂. Estas alterações terão contribuído para a manutenção

da atividade potencial da maquinaria fotossintética em seca severa (mesmo em aCO₂) e maior uso potencial de uso fotoquímico de energia (Semedo *et al.*, 2021), decrescendo a probabilidade de produção de moléculas reativas de Chl e O₂.

Em resumo, os resultados apontam para tolerância à seca moderada de ambos os genótipos, e uma maior resiliência à seca severa (ambas as [CO₂]) de Icatu, associada principalmente ao reforço de mecanismos antioxidativos e de dinâmica da matriz lipídica dos cloroplastos. Em seca severa, o eCO₂ mitigou os impactos em CL153 e reforçou a resposta à seca de Icatu, o que em ambos os casos é claramente relevante num contexto de resposta de *Coffea* spp. às alterações climáticas.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul Jaleel, C., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sankar, B., Gopi, R., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. (2007) Alterations in osmoregulations, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59:150-157.
- Abo Gamar, M.I., Kisiala, A., Emery, R.J.N., Yeung, E.C., Stone, S.L., Qaderi, M.M. (2019) Elevated carbon dioxide decreases the adverse effects of higher temperature and drought stress by mitigating oxidative stress and improving water status in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 250:1191-1214.
- Adams III, W.W., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T.N., Brightwell, A.K., Ebbert, V. (2002) Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants. *Plant Biology*, 4: 545-557.
- Ainsworth, E.A., Rogers, A. (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell & Environment*, 30:258-270.
- Allen, C.F., Good, H.S., Chisum, P., Fowler, S.D. (1966) Methodology for the separation of plant lipids and application to spinach leaf and chloroplast lamellae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 43:223.
- Anaraki, Z.E., Tafreshi, S.A.H., Shariati, M. (2018) Transient silencing of heat shock proteins showed remarkable roles of HSP70 during adaptation to stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 155:142-157.
- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55:373-399.
- Asada, K. (1994) Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: Baker N.R., Bowyer J.R. (Ed.) *Photoinhibition of photosynthesis – from molecular mechanisms to the field*, Oxford: BIOS Scientific Publishers; pp. 129-142.

- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141:391-396.
- Avila, R.T., Almeida, W.L., Costa, L.C., Machado, K.L., Barbosa, M.L., de Souza, R.P., Martino, P.B., Juárez, M.A.T., Marçal, D.M.S., Martins, S.C.V., Ramalho, J.D.C., DaMatta, F.M. (2020a) Elevated air [CO₂] improves photosynthetic performance and alters biomass accumulation and partitioning in drought-stressed coffee plants. *Environmental and Experimental Botany*, 177:104137.
- Avila, R.T., Cardoso, A.A., Almeida, W.L., Costa, L.C., Machado, K.L.G., Barbosa, M.L., de Souza, R.P.B., Oliveira, L.A., Batista, D.S., Martins, S.C.V., Ramalho, J.D.C., DaMatta, F.M. (2020b) Coffee plants respond to drought and elevated [CO₂] through changes in stomatal function, plant hydraulic conductance, and aquaporin expression. *Environmental and Experimental Botany*, 177:104148.
- Awasthi, R., Gaur, P., Turner, N.C., Vadez, V., Siddique, K.H.M., Nayyar, H. (2017) Effects of individual and combined heat and drought stress during seed filling on the oxidative metabolism and yield of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes differing in heat and drought tolerance. *Crop & Pasture Science*, 68:823-841.
- Barbosa, M.R., Silva, M.M.A., Willadino, L., Ulisses, C., Camara, T.R. (2014) Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. *Ciência Rural*, 44(3):453-460.
- Barnes, A.C., Benning, C., Roston, R.L. (2016) Chloroplast membrane remodeling during freezing stress is accompanied by cytoplasmic acidification activating SENSITIVE TO FREEZING2. *Plant Physiology*, 171:2140-2149.
- Batista-Santos, P., Lidon, F.C., Fortunato, A., Leitão, A.E., Lopes, E., Partelli, F., Ribeiro, A.I., Ramalho, J.C. (2011) The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. – Photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. *Journal Plant Physiology*, 168:792-806.
- Bhattacharjee, S. (2010) Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: Gupta S.D. (Ed.) *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*, Science Publishers, Enfield, USA, pp. 1–30.
- Birami, B., Nägele, T., Gattmann, M., Preisler, Y., Gast, A., Arneth, A., Ruehr, N.K. (2020) Hot drought reduces the effects of elevated CO₂ on tree water use efficiency and carbon metabolism. *New Phytologist*, 226:1607-1631.
- Bokhari, S. A., Wan, X.-Y., Yang, Y. W., Zhou, L., Tang, W.-L., Liu, J.-Y. (2007). Proteomic response of rice seedling leaves to elevated CO₂ levels. *Journal of Proteome Research*, 6:4624-4633.

- Boudière, L., Michaud, M., Petroustos, D., Rebeille, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J., Block, M.A., Marechal, E. (2014) Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. *BBA-Bioenergetics*, 1837:470-480.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Buezo, J., Sanz-Saez, A., Moran, J.F., Soba, D., Aranjuelo, I., Esteban R. (2019) Drought tolerance response of high-yielding soybean varieties to mild drought: physiological and photochemical adjustments. *Physiologia Plantarum*, 166:88-104.
- Bukhov, N.G., Wiese, C., Neimanis, S., Herber, U. (1999) Heat sensitivity of chloroplasts and leaves. Leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport. *Photosynthesis Research*, 59:81-93.
- Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C., Nunes, M.A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*, 160:283-292.
- Cassia, R, Nocioni, M, Correa-Aragunde, N, Lamattina, L. (2018) Climate Change and the Impact of Greenhouse Gasses: CO₂ and NO, Friends and Foes of Plant Oxidative Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9:273.
- Catarino, I.C.A., Monteiro, G.B., Ferreira, M.J.P., Torres, L.M.B., Domingues, D.S., Centeno, D.C., Lobo, A.K.M., Silva, E.A. (2021) Elevated [CO₂] Mitigates drought effects and increases leaf 5-O-caffeoylquinic acid and caffeine concentrations during the early growth of *Coffea arabica* plants. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 5:676207.
- Chaves, A.R.M., Ten-Caten, A., Pinheiro, H.A., Ribeiro, A., DaMatta F.M. (2008) Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. *Trees*, 22:351.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30:239–264.
- Chen, D.Q., Wang, S.W., Qi, L.Y., Yin, L.N., Deng, X.P. (2018) Galactolipid remodeling is involved in drought-induced leaf senescence in maize. *Environmental and Experimental Botany*, 150:57-68.
- Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E., Mittler, R. (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, 90:856-867.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53:159-182.

- Dall'Osto L., Holt N.E., Kaligotla S., Fuciman M., Cazzaniga S., Carbonera D., Frank, H.A., Alaric, J., Bassi, R. (2012) Zeaxanthin protects plant photosynthesis by modulating chlorophyll triplet yield in specific light-harvesting antenna subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 287:41820-41834.
- DaMatta, F.M., Rahn, E., Läderach, P., Ghini, R., Ramalho, J.C. (2019) Why could the coffee crop endure climate change and global warming to a greater extent than previously estimated? *Climate Change*, 152:167-178.
- De Las Rivas, J., Telfer, A., Barber, J. (1993) Two coupled beta-carotene molecules protect P680 from photodamage in isolated photosystem two reaction centres. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1142:155-164.
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S.S., Pozhvanov, G.A., Sokolik, A., Yurin, V. (2014) Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment, *Journal of Experimental Botany*, 65:1259-1270.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1:21-26.
- Dubberstein, D., Lidon, F.C., Rodrigues, A.R., Semedo, J.N., Marques, I., Rodrigues, W.P., Gouveia, D., Armengaud, J., Semedo, M.C., Martins, S., Simões-Costa, M.C., Moura, I., Pais, I.P., Scotti-Campos, P., Partelli, F.L., Campostrini, E., Ribeiro-Barros, A.I., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2020) Resilient and sensitive key points of the photosynthetic machinery of *Coffea spp.* to the single and superimposed exposure to severe drought and heat stresses. *Frontiers in Plant Science*, 11:1049.
- Dubertret, G., Gerard-Hirne, C., Trémolières, A. (2002) Importance of *trans*-3-hexadecenoic acid containing phosphatidylglycerol in the formation of the trimeric light harvesting complex in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40:829-836.
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., Jaćević, V. (2021) The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in Plant Science*, 11:552969.
- Dumont, S., Rivoal, J. (2019). Consequences of oxidative stress on plant glycolytic and respiratory metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 10:166.
- El-Bashiti, T., Hamamci, H., Oktem, H.A, ucel, M. (2005) Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science*, 169:47-54.
- Faraloni, C., Torzillo, G. (2017) Synthesis of antioxidant carotenoids in microalgae in response to physiological stress. In: Cvetkovic, D. (Ed). *Carotenoides*, IntechOpen, 9:702.

- Farooq, M.A., Niazi, A.K., Akhtar, J., Saifullah, Farooq, M., Souri, Z., Karimi, N., Rengel, Z., (2019) Acquiring control: the evolution of ROS-induced oxidative stress and redox signalling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141:353–369.
- Ferrari-Iliou, R., D'Arcy-Lameta, A., Iliou, J.P., Pham Thi, A.T., Monteiro de Paula, F., Vieira Silva, J., Mazliak, P. (1993) *In vitro* photodynamic lipid peroxidation of total lipophilic extracts from leaves of bean plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1166:48-54.
- Fortunato, A., Lidon, F.C., Batista-Santos, P., Leitão, A.E., Pais, I.P., Ribeiro, A.I., Ramalho, J.C. (2010) Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* spp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 167:333-342.
- Foster, J.G., Hess, J.L. (1980) Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant Physiology*, 66:482-487.
- Foyer, C.H. (2002) The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. In: Inzé D, Van Montagu M (Ed.) *Oxidative stress in plants*, Taylor & Francis, London, pp 33-68.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K. J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92:696-717.
- Fragkostefanakis, S., Röth, S., Schleiff, E., Scharf, K.-D. (2015). Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks. *Plant, Cell & Environmental*, 38:1881-1895.
- Ghassemi, S., Ghassemi-Golezani, K., Salmasi, S.Z. (2019) Changes in antioxidant enzymes activities and physiological traits of ajowan in response to water stress and hormonal application. *Scientia Horticulturae*, 246:957-964.
- 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. (2015) Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO₂ enrichment. *Climate Change*, 132:307-320.
- Gigon, A., Matos, A.R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T. (2004) Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of Botany*, 94: 345–351.
- Giossi, C., Cartaxana, P., Cruz, S. (2020) Photoprotective role of neoxanthin in plants and algae. *Molecules*, 25:4617.
- Gombos, Z., Murata, N. (1998) Genetic engineering of the unsaturation of membrane glycerolipid: effects on the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature

- stress. In: Siegenthaler P.-A., Murata N. (Ed.) Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics, Advances in Photosynthesis and Respiration, 6, Springer, Dordrecht, pp. 249-262.
- Grace, S.C., Logan, B.A., Adams III, W.W. (1998) Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. Plant Cell & Environment, 21:513-521.
- Gray, G.R., Ivanov, A.G., Krol, M., Williams, J.P., Kahn, M.U., Myscich, E.G., Huner, N.P.A. (2005) Temperature and light modulate the *trans*-3-hexadecenoic acid content of phosphatidylglycerol: light-harvesting complex II organization and non-photochemical quenching. Plant and Cell Physiology, 46:1272-1282.
- Harwood, J.L. (1998) Involvement of chloroplast lipids in the reaction of plants submitted to stress. In: Siegenthaler, P.-A., Murata, N. (Ed.) Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics, Advances in Photosynthesis and Respiration, 6, Springer, Dordrecht, pp. 287-302.
- Havaux, M., Niyogi, K.K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 96:8762-8767.
- Higashi, Y., Okazaki, Y., Myouga, F., Shinozaki, K., Saito, K. (2015) Landscape of the lipidome and transcriptome under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. Scientific Reports, 5:10533.
- Horváth, G., Melis, A., Hideg, E., Droppa, M., Vigh, L. (1987) Role of lipids in the organization and function of photosystem II studied by homogeneous catalytic hydrogenation of thylakoid membranes *in situ*. Biochimica et Biophysica Acta, 891:68-74.
- Hou, Q.C., Ufer, G., Bartels, D. (2016) Lipid signaling in plant responses to abiotic stress. Plant, Cell & Environment, 39:1029-1048.
- Iba, K. (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of Gene Engineering for Temperature Tolerance. Annual Review of Plant Biology, 53:225-245.
- Iba, K. (2006) Trienoic fatty acids and temperature tolerance of higher plants. In: Rai A.K., Takabe T. (Ed.) Abiotic Stress Tolerance in Plants, Springer, Dordrecht, pp. 61–68.
- Kalituho, L., Rech, J., Jahns, P. (2007) The roles of specific xanthophylls in light utilization. Planta, 225:423-439.
- Kang, Z., Babar, M.A., Khan, N., Guo, J., Khan, J., Islam, S., Shrestha, S., Shahi, D. (2019) Comparative metabolomic profiling in the roots and leaves in contrasting genotypes

- reveals complex mechanisms involved in post-anthesis drought tolerance in wheat. *PLoS One*, 14:e0213502.
- Kern, J., Zouni, A. (2009). Lipids in the structure of photosystem I, photosystem II and the cytochrome b_6/f complex. In: Wada H., Murata N. (Ed.) *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions.*, Series *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 30, Springer, Verlag, pp. 35-55.
- Kirschbaum, M.U.F. (2011) Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies. *Plant Physiology*, 155:117-124.
- Kumar, R.R., Goswami, S., Singh, K., Dubey, K., Rai, G.K., Singh, B., Singh, S., Grover, M., Mishra, D., Kumar, S., Bakshi, S., Rai, A., Pathak, H., Chinnusamy, V., Praveen, S. (2018) Characterization of novel heat-responsive transcription factor (TaHSFA6e) gene involved in regulation of heat shock proteins (HSPs) - A key member of heat stress-tolerance network of wheat. *Journal of Biotechnology*, 279:1-12.
- Leakey, A.D., Ainsworth, E.A., Berracchi, C.J., Zhu, X., Long, S.P., Ort, D.R. (2012) Photosynthesis in a CO₂ rich atmosphere. In: Eaton-Rye J., Julian J., Baishnab C., Sharkey T. (Ed.) *Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration*, 29, Springer, Dordrecht, pp. 733-768.
- Lenka, S.K., Katiyar, A., Chinnusamy, V., Bansal, K.C. (2011) Comparative analysis of drought-responsive transcriptome in Indica rice genotypes with contrasting drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 9:315-327.
- Li, B., Feng, Y., Zong, Y., Zhang, D., Hao, X., Ping Li, P. (2020) Elevated CO₂-induced changes in photosynthesis, antioxidant enzymes and signal transduction enzyme of soy bean under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154:105-114.
- Lichtenthaler HK, Babani F. (2004) Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Ed.) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, 28, Springer, Dordrecht, pp. 713-736.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350-382.
- Liu, X., Ma, D., Zhang, Z., Wang, S., Du, S., Deng, X., Yin, L. (2019) Plant lipid remodeling in response to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 165:174-184.
- Logan, B.A. (2005) Reactive oxygen species and photosynthesis. In *Antioxidants and Reactive Oxygen in Plants*. In: Smirnoff N. (Ed.), Oxford: Blackwell Publishing, pp 250–267.

- Martins, L.D., Tomaz M.A., Lidon F.C., DaMatta F.M., Ramalho J.C. (2014) Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. *Climatic Change*, 126:365-379.
- Martins, M.Q., Rodrigues, W.P., Fortunato, A.S., Leitao, 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. (2016) Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *Coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*, 7:947.
- Matos, M.C., Campos, P.S., Passarinho, J.A., Semedo, J.N., Marques, N.M., Ramalho, J.C., Ricardo C.P. (2010) Drought effect on photosynthetic activity, osmolyte accumulation and membrane integrity of two *Cicer arietinum* genotypes. *Photosynthetica*, 48:303-312.
- Matsubara, S., Krause, G.H., Seltmann, M., Virgo, A., Kursar, T.A., Jahns, P., Winter, K. (2008). Lutein epoxide cycle, light harvesting and photoprotection in species of the tropical genus *Inga*. *Plant, Cell & Environment*; 31:548-561.
- McCord, J.M., Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244:6049-6055.
- Menezes-Silva, P.E., Sanglard, L.M.P.V., Ávila, R.T., Morais, L.E., Martins, S.C.V., Nobres, P., Patreze, C.M., Ferreira, M.A., Araújo, W.L., Fernie, A.R., DaMatta, F.M. (2017) Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. *Journal of Experimental Botany*, 68:4309-4322.
- Metcalf, L. D., Schmitz, A. A., Pelka, J. R. (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Annals of Chemistry*, 38:514-515.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7:405-10.
- Mondolot, L., La Fisca, P., Buatois, B., Talansier, E., DeKochko, A., Campa, C. (2006) Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Annals of Botany*, 98:33-40.
- Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58:459-481.
- Murata, N, Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1767:414-421.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22:867-880.

- Nishiyama, Y., Murata, N. (2014) Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:8777-8796.
- Niu, G. Guo, Q., Wang, J., Zhao, S., He, Y., Liu, L. (2020) Structural basis for plant lutein biosynthesis from α -carotene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 117:4150-14157.
- Niu, Y., Xiang, Y. (2018) An overview of biomembrane functions in plant responses to high temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, 9:915.
- Niyogi, K.K., Li, X-P., Rosenberg, V., Jung, H-S. (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, 56:375-382.
- Noctor, G, Reichheld, J.P., Foyer, C.H. (2018) ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80:3-12.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Phan Tran, L.-S. (2013). Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 64:445-458.
- Partelli F.L., Vieira H.D., Viana A.P., Batista-Santos P., Leitão A.E., Ramalho J.C. (2009) Low temperature impact on photosynthetic parameters in coffee genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44:1404-1415.
- Partelli, F.L., Batista-Santos, P., Scotti-Campos, P., Pais, I.P., Quantin, V.L., Vieira, H.D., Ramalho, J.C. (2011) Characterization of the main lipid components of chloroplast membranes and cold induced changes in *Coffea* spp. *Environmental and Experimental Botany*, 74:194-204.
- Perlikowski, D., Kierszniowska, S., Sawikowska, A., Krajewski, P., Rapacz, M., Eckhardt, Ä., Kosmala, A. (2016). Remodeling of leaf cellular glycerolipid composition under drought and re-hydration conditions in grasses from the *Lolium-festuca* complex. *Frontiers in Plant Science*, 7:1027.
- Powles, S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiology*, 35:15-14.
- Raja, V., Majeed, U., Kang, H., Andrabi, K.I., John, R. (2017) Abiotic stress: interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Journal of Experimental Botany*, 137:142-157.
- Ramalho, J.C., Campos, P.S., Teixeira, M., Nunes, M.A. (1998) Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Science*, 135:115-124.

- Ramalho, J.C., Pais, I.P., Leitão, A.E., Guerra, M., Reboredo, F.H., Máguas, C.M., Carvalho, M.L., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.C., DaMatta, F.M. (2018b). Can elevated air [CO₂] conditions mitigate the predicted warming impact on the quality of coffee bean? *Frontiers in Plant Science*, 9:287.
- Ramalho, J.C., Pons, T., Groeneveld, H., Azinheira, H.G., Nunes, M.A. (2000) Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: Role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Functional Plant Biology (ex- Australian Journal of Plant Physiology)*, 27:43-51.
- Ramalho, J.C., Pons, T., Groeneveld, H., Nunes, M.A. (1997) Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposure in relation to N availability. *Physiologia Plantarum*, 101:229-239.
- Ramalho, J.C., Quartin, V., Leitão, A.E., Campos, P.S., Carelli, M.L., Fahl, J.I., Nunes, M.A. (2003) Cold acclimation ability of photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. *Plant Biology*, 5:631-641.
- Ramalho, J.C., Rodrigues, A.P., Lidon, F.C., Marques, L.M.C., Leitão, A.E., Fortunato, A.F., Pais, I.P., Silva, M.J., Scotti-Campos, P., Lopes, A., Reboredo, F.H., Ribeiro-Barros, A.I. (2018a) Stress cross-response of the antioxidative system promoted by superimposed drought and cold conditions in *Coffea* spp. *PloS ONE*, 13:e0198694.
- 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. (2013) Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. *PloS ONE*, 8:e82712.
- Ramalho, J.C., Zlatev, Z.S., Leitão, A.E., Pais, I.P., Fortunato, A., Lidon, F.C. (2014) Moderate water stress causes differential stomatal and non-stomatal changes on the photosynthetic functioning of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes. *Plant Biology*, 16:133-146.
- 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., Goulão, 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. (2016) Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *Coffea canephora* species. *Global Change Biology*, 22:415-431.
- Ruban, A.V. (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Biology*, 170:1903-1916.

- Ruelland, E., Kravets, V., Derevyanchuk, M., Martinec, J., Zachowski, A., Pokotylo, I. (2015). Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environmental and Experimental Botany*, 114: 129-143.
- Sahsah, Y., Campos, P., Gareil, M., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T. (1998) Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Physiologia Plantarum*, 104:577-586.
- Schaedle, M., Bassham, J.A. (1977) Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiology*, 59:1011–1012.
- Schindler, C., Reith, P., Lichtenthaler, H.K. (1994) Differential levels of carotenoids and decrease of zeaxanthin cycle performance during leaf development in a green and an aurea variety of tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 143:500-507.
- Schölander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D., Emingsen, E.A. (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148:339-346.
- Scotti-Campos, P., Duro, N., da Costa, M., Pais, I.P., Rodrigues, A.P., Batista-Santos, P., Semedo, J.N., Leitão, A.E., Lidon, F.C., Pawlowski, K., Ramalho, J.C., Ribeiro-Barros, A.I. (2016) Antioxidative ability and membrane integrity in salt-induced responses of *Casuarina glauca* Sieber ex Spreng. in symbiosis with N₂-fixing *Frankia* Thr or supplemented with mineral nitrogen. *Journal of Plant Physiology*, 196:60-69.
- Scotti-Campos, P., Pais, I.P., Partelli, F.L., Batista-Santos, P., Ramalho, J.C. (2014). Phospholipids profile in chloroplasts of *Coffea* spp. genotypes differing in cold acclimation ability. *Journal of Plant Physiology*, 171:243-249.
- Scotti-Campos, P., Pais, I.P., Ribeiro-Barros, A.I., Martins, L.D., Tomaz, M.A., Rodrigues, W.P., Campostrini, E., Semedo, J.N., Fortunato, A.S., Martins, M.Q., Partelli, F.L., Lidon, F.C., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2019) Lipid profile adjustments may contribute to warming acclimation and to heat impact mitigation by elevated [CO₂] in *Coffea* spp. *Environmental and Experimental Botany*, 167:103856.
- Scotti-Campos P., Pham-Thi A., Semedo J.N., Pais I.P., Ramalho J.C., Matos M.C. (2013) Physiological responses and membrane integrity in three *Vigna* genotypes with contrasting drought tolerance. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25:1002-1013.
- Scotti-Campos, P., Semedo, J.N., Pais, I.P., Oliveira, M., Passarinho, J., Santos, M., Almeida, A.S., Costa, A.R., Pinheiro N., Bagorro, C., Coco, J., Costa, A., Coutinho, J., Maçãs, B. (2015). Physiological responses to drought in four developed *Triticum aestivum* groups. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27:178-185.

- Sebastiana, M., Duarte, B., Monteiro, F., Malhó, R., Caçador, I., Matos A.R. (2019) The leaf lipid composition of ectomycorrhizal oak plants shows a drought-tolerance signature. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144:157-165.
- Semedo, J.N., Rodrigues, A.P., Lidon, F.C., Pais, I.P., Marques, I., Gouveia, D., Armengaud, J., Semedo, M.C., Martins, S., Simões, M.C., Moura, I., Dubberstein, D., Partelli, F.L., Silva, M.J., Reboredo, F.H., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2021). Intrinsic non-stomatal resilience to drought of photosynthetic apparatus in *Coffea* spp. can be strengthened by elevated air CO₂. *Tree Physiology*, 41:708-727.
- Semedo, J.N., Rodrigues, W.P., Martins, M.Q., Martins, L.D., Pais, I.P., Rodrigues, A.P., Leitão, A.E., Partelli, F.L., Campostrini, E., Tomaz, M.A., Reboredo, F.H., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.C., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C. (2018) Coffee responses to drought, warming and high [CO₂] in a context of future climate change scenarios. In: Alves F., Leal W., Azeiteiro U (Ed.) *Theory and Practice of Climate Adaptation*, 26, Climate Change Management Series, Springer, Cham, Switzerland, pp 465-477.
- Shi, Y., Yue, X., An, L. (2018) Integrated regulation triggered by a cryophyte ω-3 desaturase gene confers multiple-stress tolerance in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 69: 2131-2148.
- Siegenthaler, P.-A., Tremolieres, A. (1998). Role of acyl lipids in the function of photosynthetic membranes in higher plants. In: Siegenthaler P.-A., Murata N. (Ed.) *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, Advances in Photosynthesis and Respiration, 6., Springer, Dordrecht, pp. 145-173.
- Silva, E.N., Ferreira-Silva, S.L., Fontenele, A.V., Ribeiro, R.V., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G. (2010) Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *Journal of Plant Physiology*, 167:1157-1164.
- Smirnoff, N. (2005) Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: Smirnoff N. (Ed.) *Antioxidants and Reactive Oxygen in Plants*, Oxford: Blackwell Publishing, pp 1-24.
- Tang, T., Yu, A., Li, P., Yang, H., Liu, G., Liu, L. (2016) Sequence analysis of the *Hsp70* family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses. *Scientific Reports*, 6:33650.

- Tausz-Posch, S., Tausz, M., Bourgault, M. (2020) Elevated [CO₂] effects on crops: Advances in understanding acclimation, nitrogen dynamics and interactions with drought and other organisms. *Plant Biology*, 22(Suppl. 1):38-51.
- Torres-Franklin, M.L., Gigon, A., de Melo D.F., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi A.T. (2007). Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiologia Plantarum*, 131:201–210.
- Torres-Franklin, M.L., Repellin, A., Huynh, V.B., d’Arcy-Lameta, A., Zuily-Fodil, Y., PhamThi, A.T. (2009) Omega-3 fatty acid desaturase (FAD3, FAD7, FAD8) gene expression and linolenic acid content in cowpea leaves submitted to drought and after rehydration. *Environmental and Experimental Botany*, 65:162-169.
- Tovuu, A., Zulfugarov, I.S., Lee, C. (2013). Correlations between the temperature dependence of chlorophyll fluorescence and the fluidity of thylakoid membranes. *Plant Physiology*, 147:409–416.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiya-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J.K. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affects plant water status. *The Plant Journal*, 45:523-539.
- Vijayan, P., Routaboul, J-M., Okada, J. (1998) A genetic approach to investigating membrane lipid structure and photosynthetic function. In: Siegenthaler P-A, Murata N (Ed.) *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Springer, Dordrecht, pp. 263-285.
- Wang, G.P., Li, F., Zhang, J., Zhao, M.R., Hui, Z., Wang, W. (2010) Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance of the photosynthetic apparatus to drought and heat stress in wheat. *Photosynthetica*, 48:30-41.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2004) Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Science*, 9:244–252.
- Wang, X., Li, W., Li, M., Welti, R. (2006) Profiling lipid changes in response to low temperatures. *Physiologia Plantarum*, 126:90-96.
- Werner, C., Correia, O., Beschlag, W. (2002) Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Functional Plant Biology*, 29:999-1011.
- Xin, Z., Browse, J. (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell & Environment*, 23:893-902.

- Yamamoto, Y (2016) Quality control of photosystem II: The mechanisms for avoidance and tolerance of light and heat stresses are closely linked to membrane fluidity of the thylakoids. *Frontiers in Plant Science*, 7:1136.
- Yang, L., Fountain, J.C., Ji, P., Ni, X., Chen, S., Lee, R.D., Kemerait, R.C., Guo, B. (2018) Deciphering drought-induced metabolic responses and regulation in developing maize kernels. *Plant Biotechnology Journal*, 16:1616-1628.
- Yu, B., Li, W. (2014). Comparative profiling of membrane lipids during water stress in *Thellungiella salsuginea* and its relative *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 108:77-86.
- Zhang, X.X., Xu, Y., Huang, B.R. (2018) Lipidomic reprogramming associated with drought stress priming-enhanced heat tolerance in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Plant, Cell & Environment*, 42:947-958.
- Zinta G., AbdElgawad H., Domagalska M.A., Vergauwen L., Knapen D., Nijs I., Janssens, I.A., Beemster G.T., Asard H. (2014) Physiological, biochemical, and genome-wide transcriptional analysis reveals that elevated CO₂ mitigates the impact of combined heat wave and drought stress in *Arabidopsis thaliana* at multiple organizational levels. *Global Change Biology*, 20:3670-3685.
- Zinta, G., Abd Elgawad, H., Peshev, D., Weedon, J.T., Van den Ende, W., Nijs, I., Janssens, I.A., Beemster, G.T.S., Asard, H. (2018) Dynamics of metabolic responses to periods of combined heat and drought in *Arabidopsis thaliana* under ambient and elevated atmospheric CO₂, *Journal of Experimental Botany*, 69:2159-2170.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste estudo evidenciou-se a resiliência intrínseca das estruturas fotossintéticas e do seu desempenho no cafeeiro submetido a condições de seca moderada em genótipos de *C. arabica* (Icatu) e *C. canephora* (CL153), assim como a capacidade resposta diferenciada dos dois genótipos na situação de seca severa, com uma maior resiliência evidenciada por Icatu. Evidencia-se igualmente que o aumento da $[CO_2]$ atmosférica (eCO_2), que previsivelmente ocorrerá ao longo do corrente século, pode vir a ter um papel relevante no desempenho e na resposta do cafeeiro a condições de forte restrição hídrica.

Nas condições de CO_2 atual (aCO_2) verificou-se que o stresse hídrico promove um forte declínio das taxas de fotossíntese. Devido a valores intrinsecamente baixos de g_s , as limitações estomáticas, mais que do mesófilo ou bioquímicas, serão a maior limitação para a fotossíntese no cafeeiro. Contudo, à medida que a severidade da seca aumenta as limitações não-estomáticas (quer ligadas à difusão de CO_2 no mesófilo, quer foto/bioquímica) passarão a dominar. Talvez ao invés do que seria de esperar, pois *C. canephora* é geralmente considerada como tolerante ao défice hídrico (nomeadamente, por ter uma sistema radicular mais desenvolvido e que pode explorar camadas mais profundas do solo, algo aqui inexistente), *C. arabica* cv. Icatu apesar do declínio evidente de P_n para valores negligíveis, demonstrou maior tolerância ao défice hídrico severo pois apresentou baixos ou nulos impactos negativos no funcionamento e teor de componentes fotossintéticos (e.g., A_{max} , F_v/F_m , PSs, actividade RuBisCO, PI_{Total} , PI_{Dyn}). Para este desempenho das plantas de Icatu em seca terá igualmente contribuído o reforço de alguns componentes da maquinaria fotossintética (e.g., transportadores de electrões como a PQ-9 e Cit *f*) assim como o aumento de abundância relativa de proteínas de maquinaria fotossintética (PSs, LHCs, CEF, RuBisCO activase) independentemente da $[CO_2]$. Finalmente, terá um papel fundamental a manutenção, ou aumento, dos componentes associados a processos de protecção (pigmentos fotoprotectores como Zea, luteína, enzimas antioxidativas como Cu,Zn-SOD, moléculas de protecção como a HSP70), aliado à dinâmica da matriz lipidica das membranas dos cloroplastos que mostrou alterações quantitativas (síntese *de novo*) e qualitativas dos seus AGs (com aumento de DBI e fluidez membranar).

Na ausência sem qualquer restrição hídrica, presença de eCO_2 potenciou de forma significativa o desempenho fotossintético em ambos os genótipos, com incrementos de 37% em CL153 e de 56% em Icatu, o que deve ser tido em conta em futuras abordagens agronómicas. Estes aumentos de P_n serão resultado da ultrapassagem das barreiras à difusão gasosa do CO_2 no mesófilo e a uma diminuição da taxa de fotorrespiração, mas também devido reforço global de diferentes componentes fotoquímicos (funcionamento dos

fotossistemas e transportadores de electrões) e bioquímicos (e.g., RuBisCO). Adicionalmente, em ambos os genótipos, as plantas desenvolvidas continuamente expostas a um nível de CO₂ elevado ($\pm 700 \mu\text{L L}^{-1}$) durante sete anos não induziu um processo de aclimação fotossintética ou estomática negativa ao nível foliar (com perda de potencial da maquinaria fotossintética).

Os resultados observados com o aumento do CO₂ atmosférico em condições de conforto hídrico (WW), verificaram-se também no desempenho das plantas sujeitas a um nível de seca moderado (MWD). Da interação destes dois fatores (eCO₂ e MWD) verificou-se um impacto positivo nas taxas de fotossíntese, atenuando de forma clara os efeitos deste nível de seca. Adicionalmente, observou-se nas plantas MWD de Icatu que o eCO₂ retardou de forma insistente a imposição da seca, e que em ambos os genótipos e o controlo da abertura estomática (aumento de g_s) terá sido desacoplada do ABA (que também aumentou). Como referido anteriormente em MWD as plantas de ambos os genótipos não mostraram impactos no potencial de funcionamento da maquinaria fotossintética e no índice de dano membranar e ambas as [CO₂], havendo contudo um reforço tendencialmente superior de algumas diversas moléculas de proteção em condições de eCO₂ (e.g., Zea, APX, Asc, HSP70) em ambos os genótipos. Contudo, foi em condições de SWD que o impacto positivo de eCO₂ se fez sentir.

Desde logo nas plantas de CL153, cujos impactos significativos no funcionamento dos PSs e nos citocromos transportadores de electrões foram largamente revertidos, assim como no decréscimo da fotoinibição crónica e do índice de dano membranar, ligado a aumentos moderados de carotenoides (significativo para a neoxantina), das enzimas antioxidativas, Asc, e menor alteração do DBI (logo menos sensível a processos de lipoperoxidação) e dos principais AGs (C18:3 e C16:0). Como referido antes, nas plantas de Icatu submetidas a SWD não se observaram impactos negativos relevantes no funcionamento potencial da maquinaria fotossintética em aCO₂. Contudo, em eCO₂ foram encontrados reforços de alguns componentes da maquinaria fotossintética (e.g, citocromos, actividade dos PSs), de moléculas com papel antioxidativo (Cu,Zn-SOD, APX, Asc) e de proteção (HSP70), enquanto foram globalmente mantidos os aumentos de carotenoides, de proteínas ligadas aos PSs, LHCs e CEF, assim como da actividade de GR, síntese *de novo* e insaturação dos AGs promovidas pela SWD já em aCO₂. No seu conjunto, em SWD estes mecanismos terão contribuído para o decréscimo da probabilidade de produção de moléculas reativas de Chl e O₂, para a reparação de estruturas eventualmente danificadas e, em última análise para para o maior uso potencial de uso fotoquímico de energia em aCO₂ e, principalmente, em eCO₂ e em Icatu.

Em resposta à questão científica inicial deste trabalho “*poderá o aumento de [CO₂] amenizar os efeitos negativos da seca?*” pode concluir-se que o eCO₂ atenuou os impactos de uma seca moderada (MWD) em ambos os genótipos, manteve a resiliência intrínseca de Icatu e melhorou o desempenho de CL153 em seca severa (SWD).

A vida na terra, como a conhecemos, depende grandemente do efeito de estufa atmosférico. Sem o efeito de estufa a temperatura média da superfície terrestre seria próxima dos -20°C. Este processo tem por base a concentração de diferentes gases de efeito de estufa, sendo os mais abundantes o vapor de água e o CO₂. O crescente aumento do CO₂ tem contribuído para o aquecimento global, e para um agravamento de muitos stresses ambientais, impactantes de todas as actividades humana, como as secas.

Com as previsões a apontarem para um aumento gradual das [CO₂] até ao final do século, o sector primário deverá olhar para este fenómeno, e ponderar possíveis efeitos mitigadores do CO₂ elevado na produtividade das culturas face a condições climáticas mais desfavoráveis. Perspetivando esta realidade futura, e com base neste estudo, será fundamental continuar e aprofundar uma investigação com base fisiológica, para conhecer e seleccionar de entre a vasta riqueza genética novos genótipos melhor adaptados, sempre direccionados para o incremento das produções e para a qualidade do produto final. Este conhecimento deverá contribuir para a implementação de novos programas de melhoramento genético (*i.e.*, avaliação de genes ativos/reprimidos nas condições propostas) e assim capacitar o sector com os genótipos mais eficientes. De um modo mais amplo, em simultâneo com o melhoramento, será fulcral melhorar todo o conhecimento da gestão da rega na cultura do café, saber quando e quanto regar, otimizando desta forma a eficiência do uso da água, recurso precioso e cada mais vez escasso. Em conjunto, estes conhecimentos deverão contribuir para novas técnicas agronómicas de condução da cultura do café nos cenários climáticos futuros.

5. APÊNDICES

Tabela suplementar S1 – Resultados de uma ANOVA tridimensional considerando as variáveis genótipo (G), regime hídrico (W) e [CO₂] do ar, assim como pela sua interação com os diferentes parâmetros fisiológicos e bioquímicos: potencial hídrico foliar de pré alvorada (Ψ_{pd}), índice de stresse hídrico (CWSI), índice de condutância estomática (I_G), taxa de fotossíntese líquida (P_n), condutância estomática para vapor de água (g_s), concentração interna de CO₂ (C_i), capacidade fotossintética máxima (A_{max}), teor de ácido abscísico foliar (ABA), taxas potenciais de transporte de eletrões do fotossistema (PS) I e PSII (com e sem complexo da evolução de oxigénio - OEC), atividade inicial, total, percentagem de ativação da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase (RuBisCO) e atividade máxima da ribulose-5-fosfato quinase (Ru5PK), fluorescência basal (F_0), eficiência fotoquímica potencial do PSII (F_v/F_m), coeficiente fotoquímico de amortecimento (*quenching*) (q_L), eficiência fotoquímica potencial do PSII à luz (F_v'/F_m'), estimativa da taxa de inativação do PSII (F_s/F_m'), estimativas dos rendimentos quânticos do transporte não cíclico de eletrões ($Y_{(II)}$), das dissipações regulada ($Y_{(NPQ)}$) e não regulada de energia ($Y_{(NO)}$) do PSII bem como dos teores dos transportadores tilacoidais de eletrões: plastoquinona (PQ-9), citocromo *b_{559LP}* (*Cit b_{559LP}*), citocromo *b_{559HP}* (*Cit b_{559HP}*), citocromo *f* (*Cit f*) e citocromo *b₅₆₃* (*Cit b₅₆₃*), em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu, cultivadas sob 380 $\mu\text{L L}^{-1}$ ou 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂ atmosférico e submetidas a conforto hídrico (WW), seca moderada (MWD) e seca severa (SWD).

Parâmetros	G	[CO ₂]	W	G x [CO ₂]	G x W	[CO ₂] x W	G x [CO ₂] x W
Ψ_{pd}	ns	***	*	ns	ns	*	*
CWSI	ns	*	***	ns	ns	*	ns
I_G	ns	*	***	ns	ns	ns	ns
P_n	ns	***	***	ns	ns	***	ns
g_s	ns	ns	***	ns	ns	**	ns
C_i	ns	***	***	*	ns	***	*
A_{max}	ns	**	***	ns	ns	ns	ns
ABA	ns	***	***	*	*	ns	**
F_0	***	***	***	ns	ns	***	ns
F_v/F_m	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns
F_v'/F_m'	ns	***	***	ns	***	ns	ns
$Y_{(II)}$	ns	***	***	*	ns	**	ns
$Y_{(NPQ)}$	ns	***	***	ns	ns	***	ns
$Y_{(NO)}$	ns	ns	*	*	ns	***	ns
q_L	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns
F_s/F_m'	ns	***	***	*	ns	**	ns
PSII+OEC	ns	***	ns	***	***	***	ns
PSII-OEC	***	***	*	***	***	***	ns
PSI	ns	***	*	***	***	***	ns
PQ-9	ns	*	**	*	ns	ns	ns
Cyt <i>b_{559LP}</i>	***	***	***	***	***	***	***
Cyt <i>b_{559HP}</i>	***	***	***	***	***	***	***
Cyt <i>f</i>	***	**	***	***	***	*	**
Cyt <i>b₅₆₃</i>	***	***	***	***	***	***	***
Actividade Inicial da RuBisCO	ns	***	***	ns	***	***	ns
Actividade Total da RuBisCO	ns	ns	***	ns	***	***	ns
% de Activação da RuBisCO	***	***	**	ns	*	ns	ns
Ru5PK	***	*	***	ns	ns	***	ns

Tabela suplementar S2 – Resultados de uma ANOVA tridimensional considerando as variáveis genótipo (G), regime hídrico (W) e [CO₂] do ar, assim como pela sua interação com os valores estimados da quantidade relativa de proteínas do aparelho fotossintético relacionadas com os fotossistemas (PS) I e II, complexo da evolução do oxigênio (OEC) relacionado com o PSII, complexos de armazenamento de luz (LHC) I e II, ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase / oxigenase (RuBisCO), RuBisCO activase, e o fluxo cíclico de elétrons (CEF) do PSI e II, em plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon Clone 153 (CL153) e *Coffea arabica* cv. Icatu cultivadas sob 380 µL L⁻¹ ou 700 µL L⁻¹ de CO₂ atmosférico e submetidas a conforto hídrico (WW), seca moderada (MWD) e seca severa (SWD).

Proteínas	G	[CO ₂]	W	G x [CO ₂]	G x W	[CO ₂] x W	G x [CO ₂] x W
Fotossistema II e Complexo de Evolução do Oxigênio							
Cc07_g05350 - Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns
Cc05_g00840 - Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cc01_g10720 - Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cc10_g11890 - Photosystem II 22 kDa protein, chloroplastic	***	**	***	ns	**	ns	ns
Cc02_g35130 - PsbP domain-containing protein 1, chloroplastic	*	**	ns	ns	ns	ns	ns
Cc06_g20190 - PsbP domain-containing protein 6, chloroplastic	***	ns	***	ns	**	ns	ns
Luz- Complexo Proteico de Armazenamento do Fotossistema II							
Cc10_g16210 - Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic	***	ns	**	ns	ns	*	ns
Cc09_g09500 - Chlorophyll a-b binding protein 36, chloroplastic	***	ns	***	ns	*	ns	ns
Cc09_g09030 - Chlorophyll a-b binding protein 21, chloroplastic	**	ns	**	ns	ns	ns	ns
Cc02_g21720 - Chlorophyll a-b binding protein CP24 10A, chloroplastic	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cc05_g12720 - Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic	***	ns	*	ns	**	ns	ns
Cc11_g16910 - Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	***	ns	***	ns	**	ns	ns
Cc09_g09020 - Chlorophyll a-b binding protein 21, chloroplastic	***	ns	***	ns	*	*	ns
Fotossistema I							
Cc03_g03590 - Photosystem I reaction center subunit II, chloroplastic	**	**	ns	ns	ns	ns	ns
Cc04_g03050 - Photosystem I reaction center subunit VI, chloroplastic	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cc09_g08490 - Photosystem I reaction center subunit psaK, chloroplastic	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cc01_g15890 - Photosystem I reaction center subunit XI, chloroplastic	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Luz- Complexo Proteico de Armazenamento do Fotossistema I							
Cc05_g09930 - Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cc09_g02010 - Chlorophyll a-b binding protein 6A, chloroplastic	***	ns	**	ns	**	ns	ns
Cc04_g16410 - Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic	***	ns	***	ns	**	ns	*
Fluxo Cíclico de Elétrons							
Cc06_g22890 - NDH-dependent cyclic electron flow 1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cc04_g05100 - NDH-dependent cyclic electron flow 1	**	ns	*	ns	ns	ns	ns
Cc08_g13730 - PGR5-like protein 1A, chloroplastic	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns
RuBisCO e RuBisCO Activase							
Cc00_g15710 - Ribulose biphosphate carboxylase small chain SSU11A, chloroplastic	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cc02_g07500 - Ribulose biphosphate carboxylase/ oxygenase activase 1, chloroplastic	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cc04_g14500 - Ribulose biphosphate carboxylase/ oxygenase activase 1, chloroplastic	***	ns	***	ns	***	*	*



