

VÂNIA APARECIDA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DA TOLERÂNCIA À SECA EM *Coffea canephora*: CONTRIBUIÇÃO RELATIVA DO SISTEMA RADICULAR E DA PARTE AÉREA

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586c
2007

Silva, Vânia Aparecida, 1977-

Caracterização fisiológica da tolerância à seca em
Coffea canephora : contribuição relativa do sistema
radicular e da parte aérea / Vânia Aparecida Silva. –
Viçosa, MG, 2007.

ix, 57f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 48-57.

1. Café - Fisiologia. 2. Stress (Fisiologia). 3. Café -
Porta-enxertos. 4. Ácido abscísico. 5. *Coffea canephora*.
6. Fisiologia vegetal. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 633.73

VÂNIA APARECIDA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DA TOLERÂNCIA À SECA EM *Coffea canephora*: CONTRIBUIÇÃO RELATIVA DO SISTEMA RADICULAR E DA PARTE AÉREA

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

APROVADA: 30 de março de 2007

**Prof. Fábio Murilo DaMatta
(Co-orientador)**

Dr. Alan Carvalho Andrade

Prof. Paolo Di Mascio

Prof. Ney Sussumu Sakiyama

**Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Orientador)**

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um novo caminho. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro”.

(Fernando Sabino)

***Aos meus pais, Waldeci e Nazaré
Às minhas irmãs, Vanisse, Vanessa e Valéria
Ao meu sobrinho Rafael
Ao meu noivo Luiz Antônio,
pelo amor e pela motivação,***

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e pelas conquistas alcançadas.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial aos seus Departamentos de Biologia Vegetal, pela oportunidade para a realização deste curso.

Aos meus pais e minhas irmãs, por tudo, e principalmente por serem meus pais e minhas irmãs. Ao maior presente das nossas vidas, Rafael.

Ao meu noivo Luiz Antonio e família pelo carinho e amizade. Ao Luiz Antonio, pelo amor e pela presença constante.

Aos meus queridos amigos Breno, Werner, Rita, José e Maurício, o que seria de mim sem a ajuda de vocês! Vocês tornaram todos os momentos mais leves e mais felizes!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro, pela orientação e apoio, fundamentais para a execução desse trabalho.

Aos professores conselheiros Andréa, Eveline e Fábio, por todo o auxílio prestado, em especial a Andréa, por ter intermediado o contato com o professor Paolo.

Ao professor Paolo Di Mascio, do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo (USP), pela orientação e colaboração nas análises de ácido abscísico. A toda sua equipe, que nos recebeu com toda a dedicação, em especial a Isaura e Fernanda, que ajudaram ativamente na realização das análises.

A Maria Amélia, pesquisadora do Incaper, pela concessão das mudas para o experimento.

Ao Marcelo Antônio Tomaz, pela amizade e colaboração para a realização das enxertias.

Ao prof. Jorge Abdala Dergam, do departamento de Biologia Animal, pelo carisma e pelo empréstimo do freezer.

Ao Dr. Alan Carvalho Andrade, pesquisador da Embrapa - Cenargen, pelo apoio e por ter aceitado a proposta de ser meu co-orientador.

Infelizmente, não pude concluir o trabalho, mas valeu pela oportunidade de acompanhar o seu trabalho durante um período no CENARGEN em Brasília.

Ao Departamento de Fitotecnia, em especial à equipe do viveiro de café pelo importante apoio na condução do experimento.

Aos professores Raimundo Barros, Marco Aurélio, Marco Oliva, Antônio Cordeiro, José Cambraia, Juraci de Oliveira, pela amizade e pelos ensinamentos compartilhados durante o curso.

Aos funcionários Geraldo, Oswaldo, Reginaldo, José Antônio, Mercês, Carlos Raimundo, e também aos demais funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pela amizade e pelo auxílio.

Às inesquecíveis amigas Deise, Aline e Ana, pela convivência harmoniosa, pela ajuda e, sobretudo pela amizade.

Ao Paulo Rogério (Palelo) e a Soami pela amizade e acolhida carinhosa em São Paulo.

Aos amigos da unidade de crescimento de plantas (UCP), Cacilda, Fábio, Rogério Ribas, Carla, Rogério Gomide e João Bosco e, em especial, ao Alan, pela amizade e colaboração durante a realização dos experimentos.

A todos os colegas de curso, em especial a Giovani, Dimas, Gustavo Resque, Ângela, Karine, Ana Maria, Elaine, Cláudio Ronchi, Wagner, Franciscleudo, Adriano, Marcelo, Roberto, Aginaldo e Daniel.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente. Ninguém cresce sozinho; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor. A todos vocês que compartilharam os meus ideais, dedico essa vitória, com a mais profunda gratidão e respeito”.

BIOGRAFIA

VÂNIA APARECIDA SILVA, filha de Waldeci Nivaldo da Silva e Nazaré Tavares da Silva, nasceu em Elói Mendes, MG, em 24 de setembro de 1977. Concluiu o ensino básico no ano de 1995, no Colégio Tiradentes, em Lavras, MG. Em março de 1996, iniciou o curso de Agronomia, na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, graduando-se em janeiro de 2001. Ingressou, em março de 2001, no Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, obtendo o título de mestre em 15 de fevereiro de 2003. Em seguida, iniciou o curso de doutorado também em Fisiologia Vegetal na UFV, concluindo-o em 30 de março de 2007. Neste mesmo ano, ingressou na FEAD-Minas, Belo Horizonte, MG, como professora do curso de Agronomia.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
MATERIAL E MÉTODOS	9
1- Material vegetal.....	9
2- Parâmetros biométricos.....	10
3- Potencial hídrico da folha	10
4- Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência.....	10
5- Composição isotópica do carbono	11
6- Ácido abscísico	11
6.1- Extração e purificação	11
6.2- Separação por HPLC e detecção por MS/MS.....	12
7- Açúcares, aminoácidos, prolina e amido	13
8- Extravasamento de eletrólitos.....	13
9- Ensaio enzimáticos	14
10- Análises estatísticas	15
RESULTADOS.....	16
1- Parâmetros biométricos.....	16
2- Status hídrico	18
3- Trocas gasosas	19
4- Composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$)	21
5- Ácido abscísico	22
6- Carboidratos e aminoácidos.....	27
7- Parâmetros de fluorescência da clorofila a e pigmentos fotossintéticos.....	31
8- Estresse oxidativo	32
DISCUSSÃO	36
1- Efeito da enxertia e do déficit hídrico nos parâmetros de crescimento, trocas gasosas e ácido abscísico	36
2- Efeito da enxertia e do déficit hídrico nas concentrações de carboidratos, aminoácidos e prolina	41
3- Efeito da enxertia e do déficit hídrico no estresse oxidativo	43
CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

RESUMO

SILVA, Vânia Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Caracterização fisiológica da tolerância à seca em *Coffea canephora*: contribuição relativa do sistema radicular e da parte aérea.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-orientadores: Andréia Miyasaka de Almeida, Eveline Teixeira Caixeta e Fábio Murilo DaMatta,

A enxertia recíproca entre genótipos com respostas contrastantes à seca (clones 109 e 120, respectivamente sensível e tolerante) foi realizada com o objetivo de avaliar a contribuição relativa do sistema radicular e da parte aérea na tolerância ao déficit hídrico em *Coffea canephora*. Foram avaliadas as enxertias (enxerto/porta-enxerto) 120/109, 120/120, 109/120, 109/109, além dos respectivos pés francos 109 e 120. As plantas foram cultivadas em vasos com 12 L de substrato, em casa de vegetação. Ao atingirem seis meses, metade das plantas continuou sendo irrigada constantemente, enquanto a outra metade foi submetida à seca, imposta pela suspensão da irrigação. O pé-franco 120 e as enxertias que possuíam o clone 120, como sistema radicular, apresentaram redução mais lenta do potencial hídrico antemanhã (ψ_{am}) sob déficit hídrico, com um sistema radicular mais profundo, e menor discriminação isotópica do carbono, quando comparadas com o pé-franco 109 e autoenxertia 109/109. Aquelas plantas também apresentaram uma redução na condutância estomática (g_s) sob $\psi_{am} = -0,5$ Mpa, e maiores concentrações de ácido abscísico (ABA) foliar sob déficit hídrico moderado ($\psi_{am} = -1,0$ e $-1,5$ Mpa). Entretanto, não foi possível observar associações entre alterações na concentração foliar de ABA e g_s , nem diferenças quanto à g_s entre as plantas sob déficit moderado e severo. Por outro lado, a concentração radicular de ABA foi maior nas plantas que possuíam o sistema radicular 120, independentemente dos regimes hídricos. Essas plantas também apresentaram, sob déficit hídrico severo, reduções menos pronunciadas em A , menor extravasamento de eletrólitos, menores atividades da APX e CAT e menores acúmulos de hexoses, aminoácidos e prolina. Verificou-se também que assim como o sistema radicular, a parte aérea do clone 120 também contribui para a tolerância à seca, pois, quando comparada as plantas sensíveis 109 e 109/109, a enxertia 120/109 apresentou redução mais lenta do ψ_{am} , menor

discriminação isotópica, maior concentração de ABA foliar sob déficit hídrico moderado, e menor extravasamento de eletrólitos sob déficit severo, quando comparadas as plantas 109/109 e 109. Entretanto, a enxertia 120/109 apresentou queda mais rápida do ψ_{am} do que as plantas que possuíam o sistema radicular 120, destacando a relativa maior importância do sistema radicular para conferir tolerância à seca. Em conjunto, estes dados mostram a contribuição relativa da parte aérea e do sistema radicular na tolerância à seca e indicam a perspectiva de utilização de porta-enxertos de clones tolerantes para aumentar a tolerância à seca de genótipos mais sensíveis.

ABSTRACT

SILVA, Vânia Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2007, **Physiological characterization of drought tolerance in *Coffea canephora*: relative contribution of root system and shoot**. Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-advisors: Andréia Miyasaka de Almeida, Eveline Teixeira Caixeta and Fábio Murilo DaMatta.

With the intent to evaluate the relative contribution of the root system in *Coffea canephora* to drought stress tolerance, was performed reciprocal grafting experiments between genotypes with contrasting tolerance traits (clone 109, sensible, and clone 120, tolerant). The plants used in these experiments were control plants 109 and 120, and grafted plants 120/109, 120/120, 109/110 and 109/109. All plants were cultivated in 12 L pots for 6 months, under greenhouse conditions. After growth for six months, half plants remained irrigated, whereas the other half was subjected to water stress by withholding irrigation. Plants 120 and grafts having 120 as rootstock have showed slower reduction of predawn leaf water potential (ψ_{pd}), deeper roots and lower carbon isotopic discrimination under water deficit. These plants also have shown bigger reduction in g_s after light decrease in $\psi_{pd} = -0,5$ MPa and higher leaf ABA concentration under moderate water deficit ($\psi_{pd} = -1,0$ e $-1,5$ MPa). However changes in ABA concentration was not associated with changes in g_s , and no differences for g_s under moderate and severe water deficit were observed between different plants. Additionally, root ABA concentration was bigger in plants having the 120 root system, both in presence or absence of drought. These plants also have shown, under severe water deficit, less pronounced reductions in A , lower level of ion leakage, lower APX and CAT activities, and lower levels of hexoses, amino acids and proline. Otherwise, the 120 scion was also able to contribute to drought tolerance, since it was able to retard the evolution of water deficit, to result in higher leaf ABA concentration under moderate stress and in lower leaf ion leakage. Altogether, these data show the important contribution of root system to drought tolerance in *C. canephora*, and suggest the probable viability of the use of grafting of tolerant rootstocks for improvement of drought tolerance of more drought sensible genotypes that have other important agronomical traits.

INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas no mundo, sendo produzido por mais de 80 países, sendo que o Brasil é o maior produtor. Nos países produtores de café, há frequentemente oscilações na produtividade da cultura ocasionadas por limitações climáticas, como ocorrência de períodos de seca. O desenvolvimento de cultivares mais tolerantes a períodos de déficit hídrico, bem como o desenvolvimento de tecnologias que auxiliem as plantas a tolerar períodos prolongados de estiagem, são alternativas para a manutenção da produção agrícola brasileira e mundial. Nesse contexto, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico.

A identificação e a seleção de genótipos de *Coffea canephora* tolerantes à seca e com características agronômicas de interesse para formação de variedades clonais têm sido realizadas em diferentes regiões de cultivo no estado do Espírito Santo (Ferrão et al., 2000a). O desempenho de 500 clones de café Conilon, sob déficit hídrico, foi analisado em campo, considerando-se principalmente a produtividade média em condições ótimas de irrigação e em condições não-irrigadas (Ferrão et al., 2000a, 2000b). Uma grande variabilidade na produtividade média dos clones foi observada, destacando-se entre os mais tolerantes os clones 120, 14, 75, 01, dentre outros, cujas produtividades médias mostraram-se praticamente inalteradas, mesmo nas condições de seca. De modo oposto, clones considerados sensíveis (143, 109A, 80, etc.) apresentaram produtividades médias reduzidas em mais de 50%, quando cultivados sem irrigação.

A partir desses estudos, Da Matta et al. (2000) selecionaram alguns clones com respostas contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico, dentre eles, o clone 120 (tolerante) e clone 109 (sensível) com o objetivo de identificar e compreender os mecanismos fisiológicos de tolerância à seca em café.

As avaliações fisiológicas desses genótipos têm sugerido que a maior tolerância à seca do clone 120 pode estar associada à maior tolerância ao estresse oxidativo, à habilidade para manutenção da exportação de

assimilados e à capacidade de manutenção do status hídrico adequado, obtida mediante a combinação de sistema radicular mais profundo e controle estomático eficiente da transpiração (DaMatta e Ramalho, 2006).

Em diversas outras culturas, tem-se mostrado que a resposta estomática à seca é mediada pelo ácido abscísico (Zhang e Davies , 1991) e que o ácido abscísico (ABA) participa no mecanismo de tolerância à seca, pois seus níveis aumentam significativamente em condições de déficit hídrico. Entretanto, não existem na literatura, dados sobre o envolvimento do ABA no mecanismo de tolerância à seca em café. A concentração do ABA nas folhas pode aumentar até 50 vezes sob condições de seca, sendo esta a alteração de concentração mais severa descrita para um hormônio em resposta a um sinal ambiental (Taiz e Zeiger, 2004). O aumento de ácido abscísico nas folhas durante o déficit hídrico pode ser resultado da biossíntese nas folhas, redistribuição nas células do mesófilo e translocação de ABA sintetizado das raízes para a parte aérea (Davies e Zhang, 1991).

A influência do sistema radicular em retardar o estabelecimento de déficits hídricos internos pode, então, ocorrer em função das características morfológicas do sistema radicular ou por meio de sinais bioquímicos, como o ABA transportado da raiz para a parte aérea (Wilkinson e Davis, 1997). Uma estratégia para a avaliação da contribuição relativa da parte aérea e do sistema radicular na tolerância ao déficit hídrico consiste na utilização da técnica da enxertia recíproca entre genótipos contrastantes quanto à tolerância à seca.

A maioria das pesquisas tem priorizado o aproveitamento do sistema radicular de *C. canephora* para controlar os danos causados pelos nematóides em cultivares de *C. arabica* (Costa et al., 1991; Fahl et al., 1998; Fazuoli et al., 1983). Por outro lado, para as culturas em que a enxertia é normalmente utilizada, como citros, maçã e videira já foram realizados trabalhos mostrando a influência da enxertia na tolerância ao déficit hídrico (Lacono et al., 1998; Medina et al., 1999; Policarpo et al., 2000).

Há grande interdependência fisiológica entre o sistema radicular e a parte aérea de uma planta. Portanto, um equilíbrio fisiológico entre o enxerto/porta-enxerto pode influenciar o crescimento e a tolerância a condições ambientais (Hartmann e Kester, 1990). Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram averiguar se a utilização do porta-enxerto oriundo do clone

tolerante à seca influencia a tolerância em enxerto obtido de clone sensível à seca (combinação enxerto sensível/porta-enxerto tolerante) e verificar a contribuição relativa da parte aérea no mecanismo de tolerância à seca, mediante a combinação enxerto tolerante/porta-enxerto sensível. Além disso, buscaram-se evidências da participação do ABA no mecanismo fisiológico de tolerância à seca.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O déficit hídrico pode causar um decréscimo na fotossíntese por meio de uma limitação de CO₂, resultante do fechamento dos estômatos ou através de um efeito direto sobre a capacidade fotossintética nos cloroplastos (Chaves, 1991; Lawlor e Cornic, 2002). O controle estomático da transpiração é considerado o principal processo determinando a resposta a curto-prazo de uma planta a condições de seca, e afeta diretamente a taxa de depleção de água do solo, o potencial hídrico da planta e o transporte de solutos no fluxo xilemático (Tardieu e Simonneau, 1998). Muitas evidências mostram que esta resposta estomática à seca é mediada pelo ácido abscísico (Zhang e Davies, 1991). O ácido abscísico (ABA) é um fitohormônio que possui funções importantes no controle do desenvolvimento e na resposta a vários estresses ambientais. As concentrações de ABA nos tecidos são reguladas pela redistribuição, biossíntese, degradação, compartimentação, conjugação e transporte (Qin e Zeevaart, 1999; Cutler e Krochko, 1999; Seo e Koshiba, 2002; Nambara e Marion-Poll, 2005). O ABA pode ter uma tripla função nas respostas das plantas ao déficit hídrico. A curto prazo, o ABA promove o fechamento estomático ou inibe a abertura estomática, o que leva a redução da perda de água, pela transpiração. A longo prazo, o ABA induz a síntese de proteínas que aumentam a tolerância da planta à dessecação, como LEA (proteína expressa durante a fase de dessecação da embriogênese), canais iônicos, chaperones, enzimas da biossíntese de prolina e de açúcares, proteínas reguladoras (e.g. fatores de transcrição, proteínas-quinases e fosfolipases), enzimas antioxidantes, entre outros (Bray, 1993; Liu e Baird, 2003), as quais estão envolvidas em respostas ao estresse hídrico. A terceira função pode estar relacionada à inibição do crescimento da parte aérea com a concomitante estimulação do crescimento radicular, permitindo uma maior absorção de água por área foliar (Saab et al., 1990).

A importância do ABA na tolerância ao déficit hídrico tem sido evidenciada pela identificação e caracterização de mutantes deficientes em ABA, que apresentam falhas em etapas específicas da via de sua síntese. Os mutantes deficientes em ABA apresentam maior susceptibilidade ao murchamento e aumento da condutância estomática sob condições de

deficiência hídrica, que podem ser corrigidos pela aplicação de ABA exógeno (Schwartz et al., 2003). Além disso, maiores concentrações de ABA têm sido associadas a maior tolerância ao déficit hídrico em diversas espécies de plantas, como tomateiro (Thompson et al., 2004), *Arabidopsis* (Iuchi et al., 2001), tabaco (Qin e Zeevaart, 2002) e videira (Lacono et al., 1998)

A limitação estomática da fotossíntese é associada com redução da concentração de CO₂ nos espaços celulares da folha (C_i), o qual tem sido associado a alterações do metabolismo através da inibição de enzimas como nitrato redutase e sacarose fosfato sintase (Lawlor e Cornic, 2002). Quando a fotossíntese diminui, há a redução da quantidade de assimilados disponíveis para exportação como trioses-fosfato do cloroplasto para o citossol e, conseqüentemente, a síntese de sacarose também pode ser reduzida. Por restringir a produção e consumo de fotoassimilados, a seca inevitavelmente altera o particionamento de carboidratos nas folhas e na planta como um todo. Assim, sob déficit hídrico, a proporção entre diferentes carboidratos como amido, glicose, frutose e sacarose podem ser alteradas (Chaves, 1991).

Alterações nas concentrações de carboidratos podem refletir diferenças genótípicas na regulação e na aclimatação do metabolismo de carbono em resposta ao déficit hídrico (Lawlor e Cornic, 2002). Em café, há poucos estudos sobre efeitos do déficit hídrico no metabolismo de carboidratos. Alguns trabalhos mostram que a redução na concentração de amido é uma resposta comum das plantas de café a déficit hídrico moderado e severo (DaMatta et al., 1997a; Praxedes et al., 2005; Ronchi et al., 2005). Isto não é necessariamente acompanhado por aumento no conteúdo de hexoses, os quais dependem do genótipo, condições de crescimento e taxa de progressão do estresse (Ronchi et al., 2005), como também observado em outras espécies de plantas (Chaves, 1991).

Na medida em que a fotossíntese decresce sob condições de seca, independentemente da natureza dessa redução, a intensidade de irradiância interceptada pode exceder largamente àquela necessária para saturar a fotossíntese. Considerando-se que a limitação da assimilação do CO₂ precede a inativação das reações de transferência de elétrons nos cloroplastos, um excesso de poder redutor é normalmente gerado nas plantas sob déficit hídrico. Parte desse excesso pode ser usada para reduzir o oxigênio molecular,

levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), potencialmente capazes de resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Da Matta e Rena, 2001).

A intensidade do estresse oxidativo em uma célula é determinada pela abundância de ERO, principalmente nas formas de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil. Portanto, o equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), entre outras, é crucial para regulação dos níveis de ERO nas células. Nos mecanismos enzimáticos de destoxificação de ERO, a SOD atua como a primeira linha de defesa contra ERO, transformando o superóxido em peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio produzido pode ser convertido em água e oxigênio pela CAT (catalase) ou, somente a água pela ação do ascorbato peroxidase. O ascorbato pode reduzir radical livre de oxigênio com ou sem a catálise da APX e pode indiretamente regenerar antioxidantes ligados à membrana como o α - tocoferol (Noctor e Foyer, 1998).

O desequilíbrio entre ERO e a atividade das enzimas antioxidantes pode gerar, portanto, um excesso de ERO que pode causar peroxidação de lipídeos (Lima et al., 2002), desnaturação de proteínas e mutação do DNA (Manscher et al., 2002, Asada, 1999). Além disso, a peroxidação de lipídeos de membrana pode resultar na perda de compartimentalização celular e aumento do extravasamento de eletrólitos (Thompson et al., 1987; Asada, 1999). Lima et al. (2002) e Pinheiro (2004) associaram a maior tolerância à seca do clone 120 à maior tolerância ao estresse oxidativo, pois o clone 120 apresentou menor peroxidação de lipídios e menor extravasamento de eletrólitos que o clone sensível (clone 109), sob déficit hídrico.

O crescimento e características do sistema radicular têm um papel crucial em manter o suprimento de água para a planta, e plantas adaptadas à seca são freqüentemente caracterizadas por um sistema radicular profundo e vigoroso. Ramos e Carvalho (1997), trabalhando com 29 genótipos de café, associaram a tolerância à seca com a distribuição e estrutura do sistema radicular e Pinheiro et al. (2005) verificou que o clone 120 (tolerante à seca) apresentou o sistema radicular mais profundo que o clones sensível à seca 109.

A influência do sistema radicular no desenvolvimento das plantas e tolerância a estresses ambientais tem sido verificadas utilizando a técnica da enxertia. A enxertia é uma técnica de propagação assexuada em que se colocam em contato duas partes de tecido vegetal, de tal maneira que se unam através da regeneração dos tecidos e, posteriormente se desenvolvam, originando uma nova planta (Hoffmann et al., 1996). As interações entre enxertos e porta-enxertos podem envolver uma série de mecanismos, como a influência da enxertia no transporte de água e minerais à parte aérea (Olien e Lakso, 1986), alterações nos fatores endógenos de crescimento (hormônios, proteínas, vitaminas) (Sorice et al., 2002), influência direta da cicatrização após a enxertia no transporte através do xilema e floema (Atkinson et al., 2003).

Em plantas frutíferas, porta-enxertos clonais são amplamente utilizados para controlar o desenvolvimento vegetativo e para melhorar o rendimento e qualidade (Lockard e Schneider, 1981; Castle, 1995). Em videiras e macieiras, tem sido realizada a seleção de porta-enxertos tolerantes à seca (Souza et al., 2003). Alguns genótipos de porta-enxertos de videira e macieira são capazes de modular a fotossíntese, a condutância estomática e aumentar a tolerância ao déficit hídrico do genótipo enxertado, porém este efeito específico depende da interação entre os genótipos utilizados na enxertia (Carboneau, 1985 e Atkinson et al., 2000).

A maioria das pesquisas tem priorizado o aproveitamento do sistema radicular de *C. canephora* para controlar os danos causados pelos nematóides em cultivares de *C. arabica* (Fazuoli et al., 1983; Costa et al., 1991; Fahl et al., 1998). Enxertia de cultivares de *Coffea arabica* em porta-enxertos de *Coffea canephora*, em regiões infestadas por nematóides (*Meloidogyne incógnita*) resultam em aumentos na altura, no diâmetro de copa e na produção de plantas de café enxertadas, em relação às não enxertadas (Fazuoli et al., 1983; Costa et al. (1991). De forma a verificar a possibilidade de melhoria no vigor da planta, aumento de produção de frutos, maior eficiência no aproveitamento de nutrientes, Fahl e Carelli (1985) observaram, em condições isentas de nematóides, que plantas jovens de *C. arabica*, enxertadas sobre *C. canephora* var. robusta, apresentaram taxa de crescimento superior às plantas não enxertadas, tanto para altura como para parte aérea foliar. Fahl et al. (1998) verificaram maior desenvolvimento da parte aérea (altura e diâmetro de copa),

e maior formação de gemas frutíferas em plantas adultas de *C. arabica* enxertadas sobre progênies de *C. canephora* e de *C. congensis*. Plantas de *C. canephora* possuem um sistema radicular mais desenvolvido (Moraes e Franco, 1973), o que poderia explicar o maior crescimento dos enxertos.

Efeitos positivos de porta-enxertos de *C. canephora* em enxertos de *C. arábica* também foram recentemente observados por Tomaz et al. (2005). Entretanto estes autores observaram que alguns genótipos de *C. canephora* podem ter o efeito inverso. Nenhum estudo ainda tem sido realizado explorando o potencial de diferentes genótipos de *C. canephora* na tolerância à seca em café.

MATERIAL E MÉTODOS

1- *Material vegetal*

Foram utilizadas plantas de *Coffea canephora* Pierre var. *Conilon*, sendo um clone tolerante (120) e um clone sensível (109) ao déficit hídrico. Mudanças com quatro pares de folhas obtidas, do enraizamento de estacas, no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, foram utilizadas como pés-franco e também para as enxertias recíprocas entre os clones citados e para auto-enxertias.

A enxertia foi realizada pelo método de garfagem em fenda cheia, descrita por Oda (1995). Após a enxertia, as mudas foram mantidas em câmara de nebulização fechada por 30 dias. Após esse período, as mudas enxertadas foram colocadas em casa de vegetação, onde permaneceram por 20 dias, para aclimação. Uma vez aclimatadas, foram transferidas para vasos de 12 litros. As plantas pés-franco foram submetidas às mesmas condições que as plantas enxertadas. O substrato utilizado para enchimento dos vasos consistiu de uma mistura de solo, areia e esterco bovino (3:1:1, v/v/v). A adubação foi feita de acordo com a análise do solo, segundo recomendações de Ribeiro *et al.* (1999). As mudas foram mantidas em casa de vegetação, cujas laterais permitiam livre troca de ar entre seu interior e exterior. A densidade média de fluxo de fótons fotossintético na casa de vegetação foi de $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ao meio-dia.

Após seis meses de cultivo (abril de 2006), as plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) e sob deficiência hídrica, imposta pela suspensão da irrigação. O potencial hídrico foliar foi acompanhado periodicamente até que as plantas atingissem o potencial hídrico (ψ_w) = -3,0 MPa, na antemanhã.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com doze tratamentos e cinco repetições, formando um esquema em fatorial 6 x 2 (seis tipos de planta e dois regimes hídricos). A parcela foi constituída de uma planta por vaso. Dessa forma, o experimento foi constituído pelas plantas:

1) 120/109: Porta-enxerto do clone sensível (109) x enxerto do clone tolerante (120);

- 2) 109/120: Porta-enxerto do clone tolerante (120) x enxerto do clone sensível (109);
- 3) 120/120: Auto-enxertia do clone tolerante (120);
- 4) 109/109: Auto-enxertia do clone sensível (109);
- 5) 109: Pé-franco 109;
- 6) 120: Pé-franco 120.

2- Parâmetros biométricos

O diâmetro do caule (entre os dois primeiros entrenós) foi mensurado com um paquímetro e o comprimento do caule com uma fita métrica. A área foliar foi determinada de acordo com o método de dimensões foliares (Barros *et al.* 1973). Ao final do experimento, as plantas irrigadas e não irrigadas foram colhidas e separadas em parte aérea e raiz para análise da massa seca dos tecidos e comprimento da raiz. Para determinação da massa seca, os tecidos foram secos a 70°C, em estufa com ventilação forçada, por 72 h. O comprimento da maior raiz foi determinado com auxílio de uma fita métrica.

3- Potencial hídrico da folha

Foi determinado em folhas individuais com uma bomba de pressão tipo Scholander, na antemanhã, em folhas completamente expandidas de ramos plagiotrópicos, do meio das plantas.

4- Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência

As trocas gasosas e parâmetros de fluorescência foram analisados em folhas completamente expandidas do terceiro ou quarto pares a partir do ápice de ramos plagiotrópicos medianos das plantas. As taxas de assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática (g_s), a transpiração (E) e a razão entre concentrações interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) foram medidas em sistema aberto, 08:00 e 09:00 h, sob luz saturante artificial ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração de CO_2 ambiente, com um analisador de gás a infravermelho portátil (LCA4, Analytical Development Company-ADC, Kings Lynn, Reino Unido). A temperatura foliar estava em torno de 22 ± 2 °C e a umidade relativa 80%. Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram medidos, usando-se de um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). A fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m),

eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m'), coeficiente de extinção fotoquímica (q_P), rendimento quântico do transporte de elétrons (ϕ_{FSII}), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) e a fração de energia absorvida não utilizada na fotoquímica nem dissipada termicamente (P_E) foram estimados exatamente como descrito em DaMatta *et al.* (2002a) e Lima *et al.* (2002).

5- Composição isotópica do carbono

A composição isotópica do carbono foliar ($\delta^{13}C$) foi determinada em relação ao padrão internacional PDB (*Pee Dee Belemnite*), utilizando-se de um espectrômetro de massa (DELTA-S, Finnigan MAT, Bremen, Alemanha), conforme descrito por DaMatta *et al.* (2002a). As diferenças em $\delta^{13}C$ entre duplicatas de cada amostra foram menores que 0,2 ‰.

6- Ácido abscísico

As amostras de folhas foram coletadas no mesmo horário em que foram realizadas as análises de trocas gasosas. Foram coletadas 5 discos foliares de (1,25 cm diâmetro) de folhas completamente expandidas do terceiro ou quarto pares a partir do ápice de ramos plagiotrópicos medianos das plantas.

Quando os potenciais hídricos foliares das plantas estressadas chegaram a -0,5; -1,0; -1,5 e -3,0 MPa, as amostras de folhas das enxertias (120/109 e 109/120) e auto-enxertias (109/109 e 120/120) foram coletadas em plantas controle e estressadas. Com o objetivo de reduzir o grande número de amostras a serem analisados, nas plantas pés-francos, as amostras foliares foram coletadas somente quando os potenciais hídricos foliares das plantas estressadas estavam em -0,5 e -3,0 MPa.

Ao final do experimento, quando as plantas estressadas atingiram o potencial hídrico foliar de -3,0 MPa, 5 gramas de raízes foram coletadas aleatoriamente no sistema radicular de plantas controle e estressadas.

Após a coleta, as amostras de folhas e raízes foram imediatamente congeladas em N líquido e posteriormente liofilizadas.

6.1- Extração e purificação

Foi utilizado o protocolo descrito por Ross *et al.* (2004), com algumas modificações. Os tecidos de folha e raiz liofilizados foram macerados em N

líquido com 100% de PVPP. Foram utilizados 50 mg de massa seca de folhas e 200 mg de massa seca de raiz. Em seguida, foi colocado o solvente de extração (acetona/H₂O/ácido acético: 80/19/1). Para folhas utilizou-se 1,5 mL e para raiz 2,5 mL do solvente de extração. O extrato foi transferido para outro tubo. O almofariz foi lavado com mais 500 µL do solvente de extração (acetona/H₂O/ ácido acético : 80/19/1) e transferido para o mesmo tubo, adicionando-se 40 ng de (-)-5,8',8',8'-d₄-ABA deuterado. As amostras foram então agitadas por 30-40 min a 4°C e centrifugadas (15000 x g /10 min/4°C). O sobrenadante foi coletado e transferido para outro frasco e o resíduo lavado com mais 250 µL do solvente de extração, centrifugado (15000 x g /10 min/4°C) e o sobrenadante foi novamente coletado e adicionado ao primeiro sobrenadante. Os sobrenadantes combinados foram liofilizados, dissolvidos em 100 µL de metanol/ácido acético (99/1) mais 900 µL de H₂O/ácido acético (99/1) e, em seguida, centrifugado (15000 x g /2 min/4°C). O sobrenadante foi transferido para coluna de extração de fase sólida (SPE) (Oasis HLB 1, Waters, Milford, MA, USA) e o ABA foi eluído com 1 mL de metanol/H₂O/ácido acético (80/19/1). O extrato foi liofilizado e o concentrado foi ressuscitado em 220 µL de (85/15) (H₂O/acetonitrila com 0,07% de ácido acético), agitado em baixa velocidade por 5 min (4°C), sonificado por 5 min e centrifugado (15000 x g /10 min/4°C). O sobrenadante foi, em seguida, transferido para via injetora.

6.2- Separação por HPLC e detecção por MS/MS

As separações cromatográficas das amostras de folhas e raízes foram feitas em um cromatógrafo líquido de alto desempenho (Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (Micromass, modelo Quattro II com fonte Z-sprayTM, Manchester, Reino Unido). O HPLC possuía duas bombas LC-ADvp, um detector UV/VIS SPD-10ADvp, um autoinjeter SIL-10ADvp e um controlador de sistema SCL-10Avp.

As análises foram feitas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa no modo de ionização *electrospray* negativo (HPLC/MS/ESI-). As amostras foram analisadas, utilizando-se de uma coluna cromatográfica C-18 Supelcosil (Supelco; 15 cm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm de tamanho da partícula), com fluxo de 0,3 mL min⁻¹. Os eluentes usados foram ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B). O gradiente

linear utilizado foi de 15% a 100% de B em 20 min, 100% de B por mais 5 min, 100% a 15% de B em 2 min e 15% até 30 min. O comprimento de onda selecionado foi de 252 nm. As condições de ionização foram: voltagem do capilar de 4 kV, temperatura da fonte de 100 °C e temperatura de dessolvatação de 200 °C, voltagem do cone de amostragem e extrator de 30 V e 5 V, respectivamente, energia de colisão de 15 eV, fluxo de gás de secagem-400 L h⁻¹, fluxo de gás de dessolvatação de 15 L.h⁻¹ e argônio como gás de colisão. Os dados foram processados pelo software MassLynx NT (versão 3,2, Micromass, Altricham, Reino Unido). A detecção e quantificação de ABA nas amostras foram feitas mediante o monitoramento de reações múltiplas (MRM) via seleção da transição de massa específica da molécula de interesse (para o ABA, 263 → 153 e, para o ABA₄, 267 → 156).

7- Açúcares, aminoácidos, prolina e amido

Com o objetivo de avaliar o efeito do déficit hídrico moderado (-1,5 MPa) e déficit hídrico severo (-3,0 MPa) no metabolismo de carboidratos, quando as plantas atingiram os potenciais hídricos de -1,5 e -3,0 MPa, foram coletadas amostras de folhas completamente expandidas do terceiro ou quarto pares a partir do ápice de ramos plagiotrópicos medianos das plantas. O horário de coleta das folhas foi por volta de 9:00 h. As amostras foliares foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, para a determinação das concentrações foliares de glicose, frutose, sacarose, amido e aminoácidos solúveis totais. As amostras vegetais foram, então, submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de açúcares e aminoácidos e prolina e, na fração insolúvel, os de amido (Stitt *et al.*, 1989; Trethewey *et al.*, 1998; Praxedes *et al.*, 2006). Os teores de prolina foram determinados segundo Bates *et al.* (1973).

8- Extravasamento de eletrólitos

A porcentagem de extravasamento de eletrólitos foi determinada quando as plantas atingiram os potenciais de -1,5 e -3,0 MPa. Os discos foliares foram coletados às 10:00 h. Após a coleta, os discos foram lavados e imersos em 10 ml de água deionizada em placas de petri. As placas foram fechadas e mantidas durante 6 horas a temperatura ambiente. O extravasamento de eletrólitos na água deionizada foi estimado usando um condutivímetro (DM 31,

Digimed, Santo Amaro, Brasil) e expressado como a porcentagem da condutividade total, a qual foi obtida após colocar as placas em estufa a 90°C por 2 horas.

9- Ensaio enzimáticos

Foram determinadas as atividades de algumas enzimas-chave do sistema antioxidante: SOD, APX e CAT. As enzimas foram extraídas utilizando-se de almofariz e pistilo pré-resfriados, com polivinilpolipirrolidona (PVPP) 200 % (p/p) e 4 mL de meio de extração específico para cada enzima, como se segue: SOD [tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, DTT 1mM, β-mercaptoetanol 10 mM e Triton-100 0,1 % (v/v)]; APX [tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM, ascorbato 20 mM e Triton-100 0,1 % (v/v)]; CAT [tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM, ascorbato 20 mM e Triton-100 0,1% (v/v)]. O homogenato resultante foi centrifugado a 15000 g, por 15 min, a 4° C. O sobrenadante foi coletado e usado para quantificações protéicas (Bradford, 1976) e atividades enzimáticas.

A atividade total da SOD foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico, descrito por Giannopolitis e Ries (1977), em que a atividade da SOD é dada pela capacidade da enzima em inibir a redução fotoquímica do azul de nitrotetrazólio (NBT), sob luz. Para os ensaios de atividade, uma alíquota do extrato enzimático (5 µL) foi aplicada a 3 mL (volume final) de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 52,5 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM, metionina 13 mM (pH 7,8) e riboflavina 2 µM. A interferência inespecífica inerente ao extrato enzimático foi determinada pela adição de extrato desnaturado à mistura de reação, enquanto a produção total de azul de formazana foi determinada utilizando-se apenas o meio de reação. O ensaio de atividade foi iniciado pela exposição dos tubos contendo as referidas misturas a uma câmara contendo luz fluorescente (15 W), a 25° C, por 10 min. A reação foi paralisada desligando-se a luz, sendo a produção fotoquímica de azul de formazana determinada em espectrofotômetro (Hitachi mod. U-2000, Tóquio, Japão), a 560 nm. Uma mistura de reação mantida sob obscuridade foi utilizada como branco. A atividade da SOD (unidades mL⁻¹) foi proporcional à relação $V/v - 1$, em que V é a variação em absorbância por minuto, sem o extrato enzimático, e v é a variação em absorbância por minuto,

com o extrato. Considerou-se que 1 U de SOD corresponde à quantidade da enzima capaz de inibir a redução do NBT em 50%.

A atividade da APX foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981), com algumas modificações. O ensaio enzimático foi realizado em espectrofotômetro, após a adição de 15 μL de extrato enzimático a 985 μL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), 0,5 mM ascorbato e 0,1 mM de H_2O_2 . A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 290 nm, durante 1 min, a 25 °C. Para os cálculos da atividade, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do ascorbato ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), considerando-se que 1 U de APX corresponde à quantidade da enzima capaz de oxidar 1 μmol de ascorbato por minuto.

A atividade da CAT foi determinada pelo consumo de H_2O_2 , de acordo com Havir e McHale (1989), com algumas modificações. O ensaio enzimático foi realizado em espectrofotômetro, após a adição de 15 μL de extrato enzimático a 985 μL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e H_2O_2 12,5 mM. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 1 min, a 30 °C. Para os cálculos da atividade, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), considerando-se que, nas condições de ensaio, 1 U de CAT corresponde à quantidade da enzima capaz de oxidar 1 μmol de H_2O_2 por minuto.

10- Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas, com base no delineamento em blocos casualizados, com doze tratamentos e cinco repetições, formando um esquema em fatorial 6 x 2 (seis tipos de planta e dois regimes hídricos). A parcela foi constituída de uma planta por vaso.

Realizou-se a análise de variância dos dados à significância de 5% de probabilidade, pelo teste F, utilizando-se o programa computacional 'Sisvar', desenvolvido por Ferreira (2000). Quando diferenças significativas foram detectadas, as médias foram agrupadas pelo teste de Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

1- Parâmetros biométricos

As plantas alcançaram o $\psi_{am} = -3,0$ MPa em diferentes períodos, após a imposição do déficit hídrico, portanto as alterações de crescimento não foram completamente comparáveis entre as plantas estressadas. Além disso, os efeitos do déficit hídrico no crescimento das plantas não foram significativos devido ao curto período de imposição do déficit hídrico (dados não apresentados).

Comparando-se as plantas pés-franco, não foram observadas diferenças quanto à área foliar, diâmetro do caule, massa seca raiz/ área foliar. Apesar de a biomassa radicular ter sido 20% maior no pé-franco 109 do que no pé-franco 120, o comprimento da raiz foi 36% maior no último (Tab. 1).

As plantas auto-enxertadas tiveram menor biomassa total e área foliar, quando comparadas às respectivas plantas pés-franco. Entretanto, as diferenças entre auto-enxertias 109/109 e 120/120 seguiram padrões semelhantes aos observados nos pés-franco. As enxertias recíprocas 120/109 e 109/120 também apresentaram menores áreas foliares quando comparados a ambos os pés-francos, porém as massas secas da raiz e biomassas totais foram menores somente em relação ao pé-franco 109 (Tab. 1).

Quanto à comparação entre as enxertias, a exemplo do observado para o pé-franco 120, o comprimento da raiz foi maior nas plantas constituídas pelo sistema radicular 120 (120/120 e 109/120) do que nas plantas com o sistema radicular 109 (Tab. 1), não apresentando diferenças com relação aos parâmetros área foliar e diâmetro do caule. Entretanto, observou-se que na auto-enxertia 120/120, a massa seca da raiz, a relação massa seca raiz/ área foliar e biomassa total foram menores do que nas demais enxertias (Tab. 1).

Tabela. 1. Características morfológicas de pés -franco e enxertias de *Coffea canephora* em condições irrigadas. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre médias de clones (Teste Newman-Keuls, P≤0,05). Cada valor representa a média ± o erro-padrão de cinco repetições

Parâmetros	Pés-franco		Enxertias		
	Clone 109	Clone 120	109/109	120/120	109/120 120/109
Comprimento caule (m)	0,37 ± 0,02 a	0,32 ± 0,01 b	0,36 ± 0,02 a	0,28 ± 0,01 b	0,35 ± 0,02 a 0,31 ± 0,02 b
Diâmetro caule (cm)	0,54 ± 0,01 a	0,52 ± 0,02 a	0,51 ± 0,03 a	0,47 ± 0,01 a	0,51 ± 0,02 a 0,48 ± 0,02 a
Área foliar (m ²)	0,261 ± 0,03 a	0,245 ± 0,02 a	0,193 ± 0,04 b	0,164 ± 0,04 b	0,180 ± 0,03 b 0,185 ± 0,02 b
Massa seca raiz/ Massa seca parte aérea	0,196 ± 0,02 a	0,193 ± 0,01 a	0,195 ± 0,03 a	0,186 ± 0,01 a	0,218 ± 0,02 a 0,194 ± 0,02 a
MS raiz (g)	9,65 ± 0,81 a	8,04 ± 0,18 b	6,84 ± 0,71 b	4,94 ± 0,3 c	7,24 ± 0,56 b 7,04 ± 0,68 b
Comprimento raiz (m)	0,53 ± 0,02 c	0,72 ± 0,02 a	0,53 ± 0,02 c	0,63 ± 0,02 b	0,64 ± 0,01 b 0,57 ± 0,02 bc
Massa seca raiz/ Área foliar (g.m ²)	36,97 ± 3,50 a	33,01 ± 4,03ab	35,44 ± 2,50 a	30,12 ± 4,50 b	40,22 ± 4,30 a 38,05 ± 3,25 a
Biomassa total (g)	58,88 ± 4,50 a	49,72 ± 4,92 b	41,81 ± 4,74 b	32,86 ± 1,95 c	40,4 ± 1,8 b 43,33 ± 2,7 b

2- Status hídrico

Nas plantas-controle, o potencial hídrico foliar na ante-manhã (ψ_{am}) foi sempre superior a $-0,05$ MPa. Após a suspensão da irrigação, nas plantas pés-franco e auto-enxertias do clone 109 (sensível à seca), ψ_{am} diminuiu mais rapidamente que nas plantas pés-franco e auto-enxertia do clone 120 (Fig. 1a e 1b). O déficit hídrico severo ($-3,0$ MPa) foi alcançado aos 18 dias pelas plantas 109 e 109/109. As plantas 120 e 120/120 só atingiram $-3,0$ MPa aos 25 e 27 dias, após a imposição do déficit, respectivamente (Fig. 1a e 1b).

Quando comparado ao pé-franco 109 e auto-enxertia 109/109, ψ_{am} tendeu a diminuir mais lentamente nas combinações de enxertia 120/109 e 109/120, sendo que $\psi_{am} -3,0$ MPa foi alcançado aos 22 e 25 dias, respectivamente (Fig. 1c).

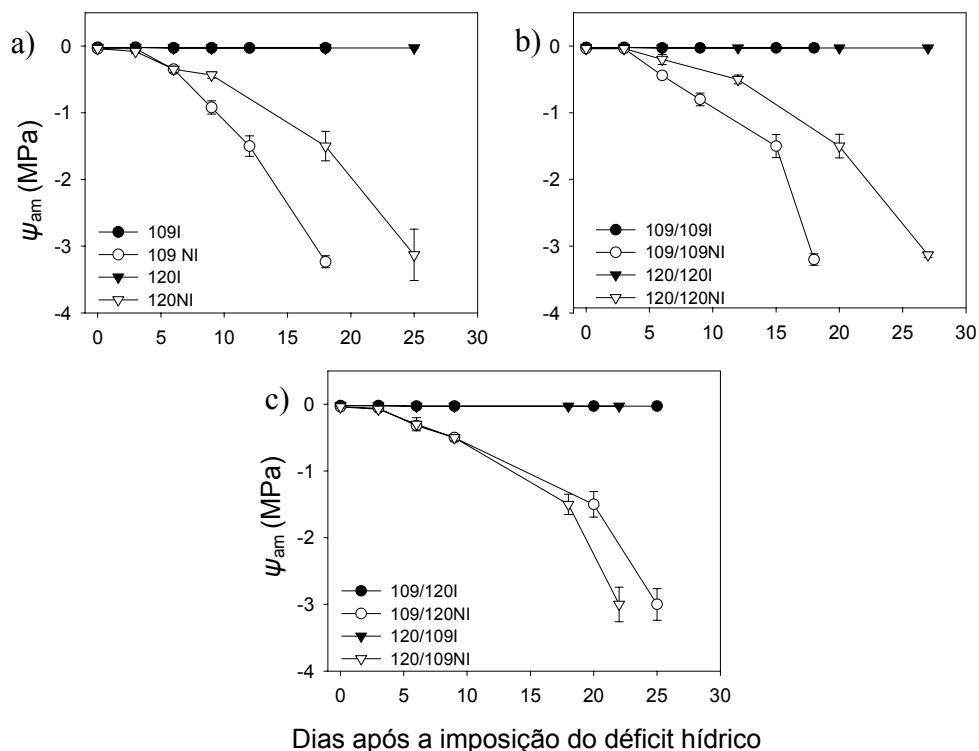


FIG. 1. Perfil temporal do potencial hídrico foliar na antemanhã (ψ_{am}) de pés-franco (a), auto-enxertias (b) e enxertias recíprocas (c) de diferentes clones de *Coffea canephora* em condições irrigadas (símbolos cheios) e sob déficit hídrico (símbolos vazios). Cada ponto representa a média \pm erro padrão de cinco repetições. I = Irrigado, NI= Não irrigado (não irrigado após a imposição do déficit hídrico)

3- Trocas gasosas

Sob irrigação, não houve diferença em A e na razão C_i/C_a entre as plantas pés-franco, auto-enxertia e enxertia recíproca (Fig. 2a e 2c). Quanto a g_s , de modo geral, em condição irrigada, maior g_s foi observada na auto-enxertia 109/109 (Fig. 2b).

Analisando-se g_s , após a suspensão da irrigação, sob $\psi_{am} = -0,5$ MPa, foi possível observar uma redução significativa em g_s nas plantas 120/120, 120 e nas combinações de enxertia 109/120 e 120/109. Esse fato não foi observado nas plantas 109 e 109/109 (Fig. 2b). As taxas transpiratórias seguiram padrão semelhante aos observados para g_s (dados não apresentados). Sob $\psi_{am} = -1,0, -1,5$ e $-3,0$ MPa, foi possível observar redução em g_s em todas as plantas, inclusive 109 e 109/109 (Fig. 2 a,b e c).

Quanto a fotossíntese, sob $\psi_{am} = -0,5$ MPa, foi possível observar uma redução significativa em A no pé-franco 120 (Fig. 2a). Embora tenha sido verificada redução em A em todas as plantas a $\psi_{am} = -1,0, -1,5$ e $-3,0$ MPa, foi possível observar que no $\psi_{am} = -3,0$ MPa, as plantas 109 e 109/109 tenderam a apresentar reduções mais pronunciadas em A , quando comparadas as demais. Nesse potencial, no pé-franco 120 e na auto-enxertia 120/120, houve redução de 55% em A e de 93% em g_s . No pé-franco 109 e auto-enxertia 109/109 a redução da A foi de 75% e, em g_s , de 96%. Nas combinações de enxertia 120/109 e 109/120, houve uma redução em torno de 60% em A e 95% em g_s (Fig. 2a). A $\psi_{am} = -3,0$ MPa, foi possível observar também que no pé-franco 109 e na auto-enxertia 109/109 a razão C_i/C_a permaneceu mais elevada (Fig 2c). Independentemente dos clones avaliados, as reduções em g_s ocorreram em maior extensão que as reduções em A , fato acompanhado por redução na razão C_i/C_a (Fig. 2a, b e c).

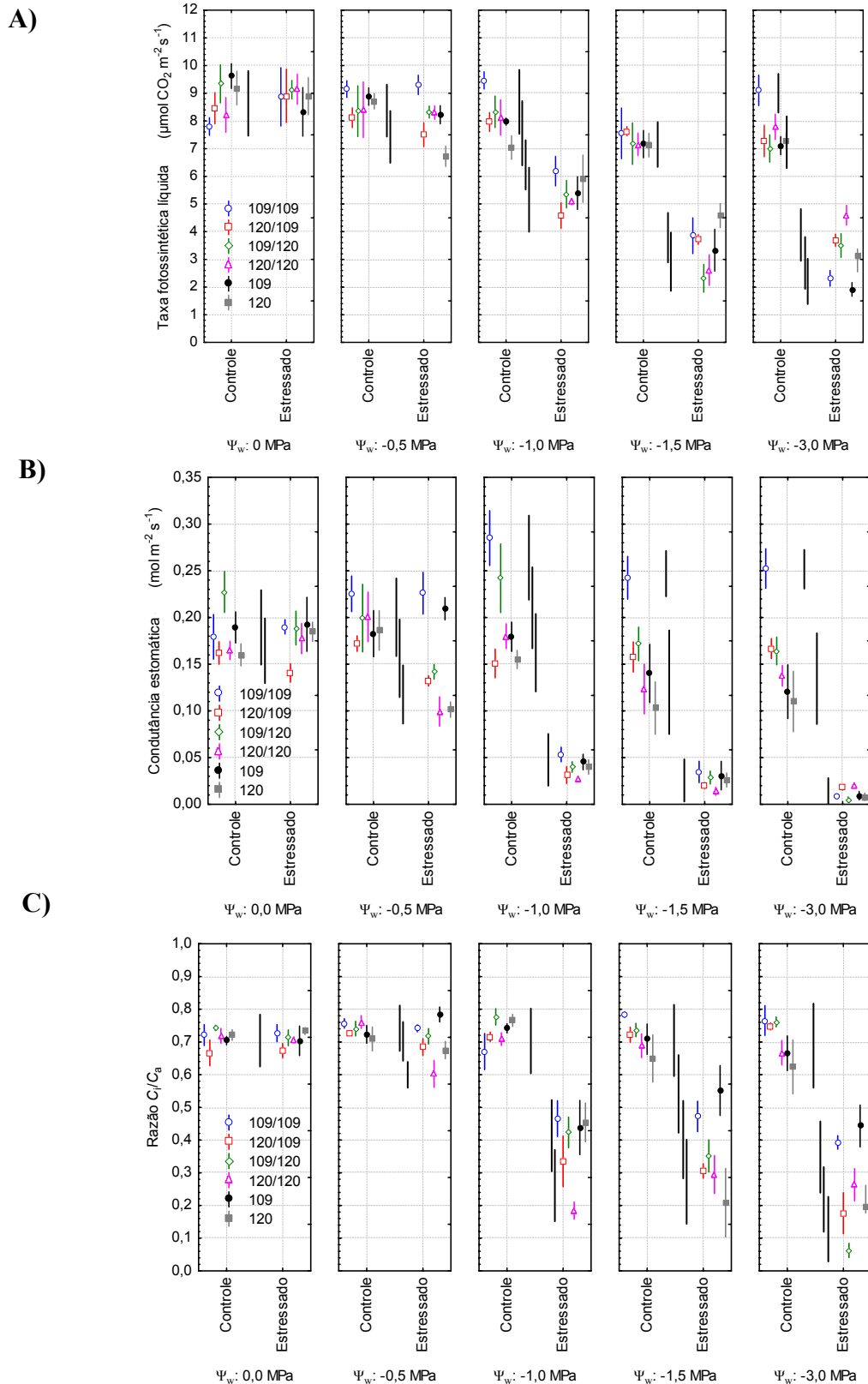


FIG. 2. Taxa fotossintética líquida de CO_2 , condutância estomática e razão entre concentração de CO_2 interna e externa (C_i/C_a) à folha, em plantas de *Coffea canephora* enxertadas e não enxertadas. Os gráficos foram ligeiramente deslocados horizontalmente de modo a facilitar a visualização das linhas verticais que representam o erro padrão da média. $n = 5$. Barras verticais

pretas sem símbolo indicam ausência de diferença significativa para os pontos localizados verticalmente na mesma posição ($P > 0,05$; teste de Duncan).

4- Composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$)

Após a imposição do déficit hídrico, $\delta^{13}\text{C}$ aumentou, significativamente, em todas as plantas (Fig. 3), o que sugere que a eficiência do uso da água (E_A) tenha aumentado durante o período de estresse. Não houve efeito da auto-enxertia, pois os valores de $\delta^{13}\text{C}$ não diferiram entre os pés-franco e suas respectivas auto-enxertias. Independentemente do déficit hídrico, observa-se que o clone 120 apresentou maior $\delta^{13}\text{C}$ que a planta 109. Do mesmo modo, a auto-enxertia 120/120 apresentou maior $\delta^{13}\text{C}$ em relação à auto-enxertia 109/109. Nas combinações de enxertia 109/120 e 120/109, a $\delta^{13}\text{C}$ foi semelhante entre os tratamentos 120 e 120/120, ambos os quais apresentaram maior discriminação quando comparadas aos tratamentos 109 e 109/109 (Fig. 3).

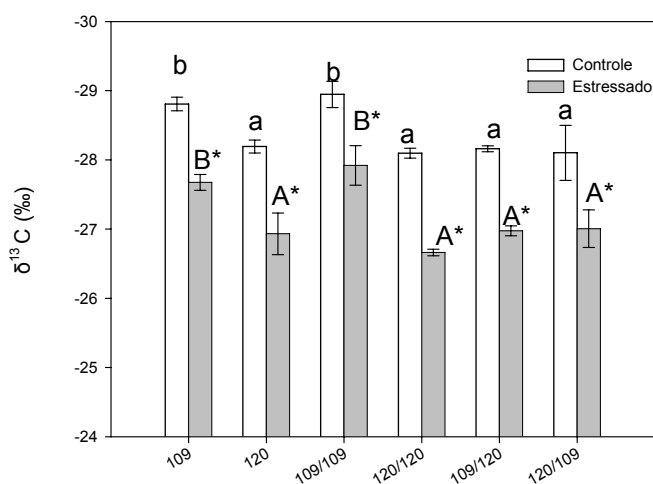


FIG. 3. Efeitos do déficit hídrico na composição isotópica de carbono foliar ($\delta^{13}\text{C}$) de pés-franco e enxertias de *Coffea canephora*. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre médias de clones irrigados, e letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de clones estressados (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$). As médias de plantas estressadas marcadas com um asterisco diferem das médias das plantas-controle (Teste F; $P \leq 0,05$). As colunas representam a média, e as barras o erro-padrão, de cinco repetições.

5- Ácido abscísico

Detecção e quantificação da ABA por HPLC/MS/MS

A detecção e quantificação da ABA e a detecção de 5,8',8',8'-ABAd₄ foram feitas através do monitoramento de reação múltipla (MRM), que é a seleção de uma transição de massa específica (ou fragmentação) da molécula de interesse. Para o ABA, a transição escolhida foi m/z 263→153 e para o padrão interno 5,8',8',8'-ABAd₄ a transição m/z 267→156. Os cromatogramas dos padrões ABA (Fig. 4a) e 5,8',8',8'-ABAd₄ (Fig. 4b) possuem, em 16 minutos, dois picos intensos, referentes aos íons moleculares do ABA e do 5,8',8',8'-ABAd₄.

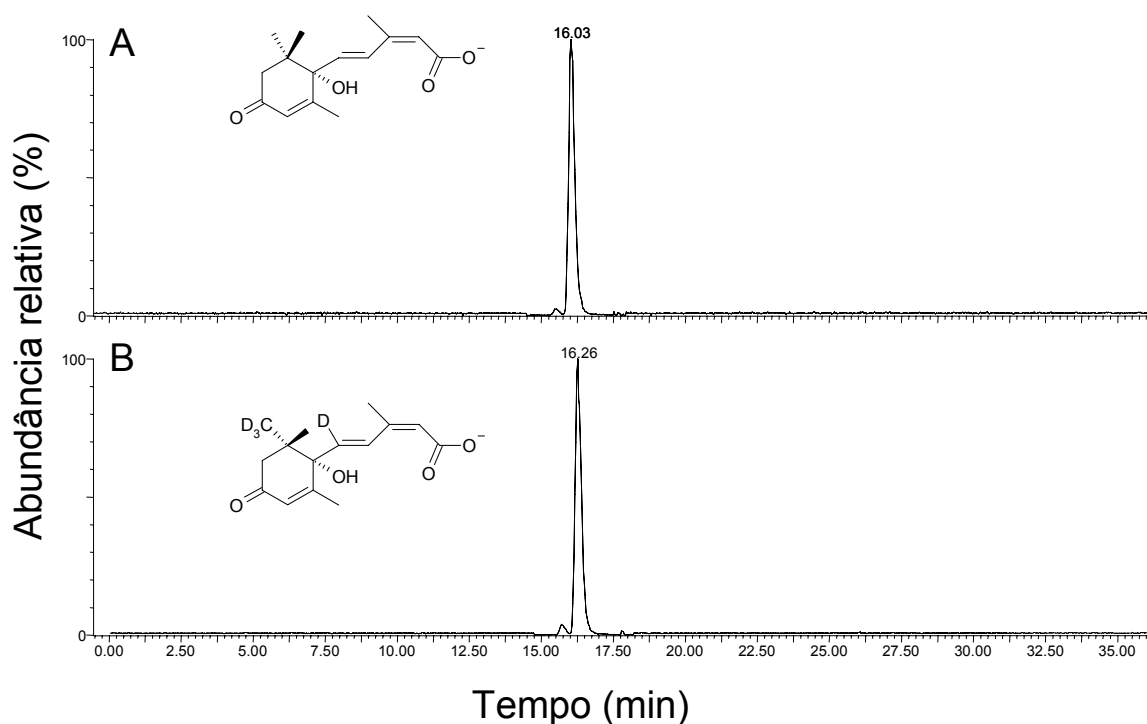


FIG. 4. Cromatogramas dos padrões ABA (a) e 5,8',8',8'-ABAd₄ (b) obtidos por HPLC/MS/ESI⁻.

Os espectros de massas do ABA (Fig. 5a) e do 5,8',8',8'-ABAd₄ (Fig. 5b) obtidos em 16 minutos, possuem dois picos predominantes com m/z 263 e m/z 267, referentes aos íons moleculares do ABA e do 5,8',8',8'-ABAd₄, respectivamente. No espectro de massas do ABA (Fig. 5a) foi possível

observar que além do pico do íon molecular (m/z 263), existe os picos com m/z 219 e m/z 153, que correspondem aos fragmentos da molécula de ABA, produzidos na ionização dentro do espectrômetro de massas. O espectro de massas do padrão interno 5,8',8',8'-ABAd₄ (Fig. 5b) também possui fragmentos com m/z 223 e m/z 156.

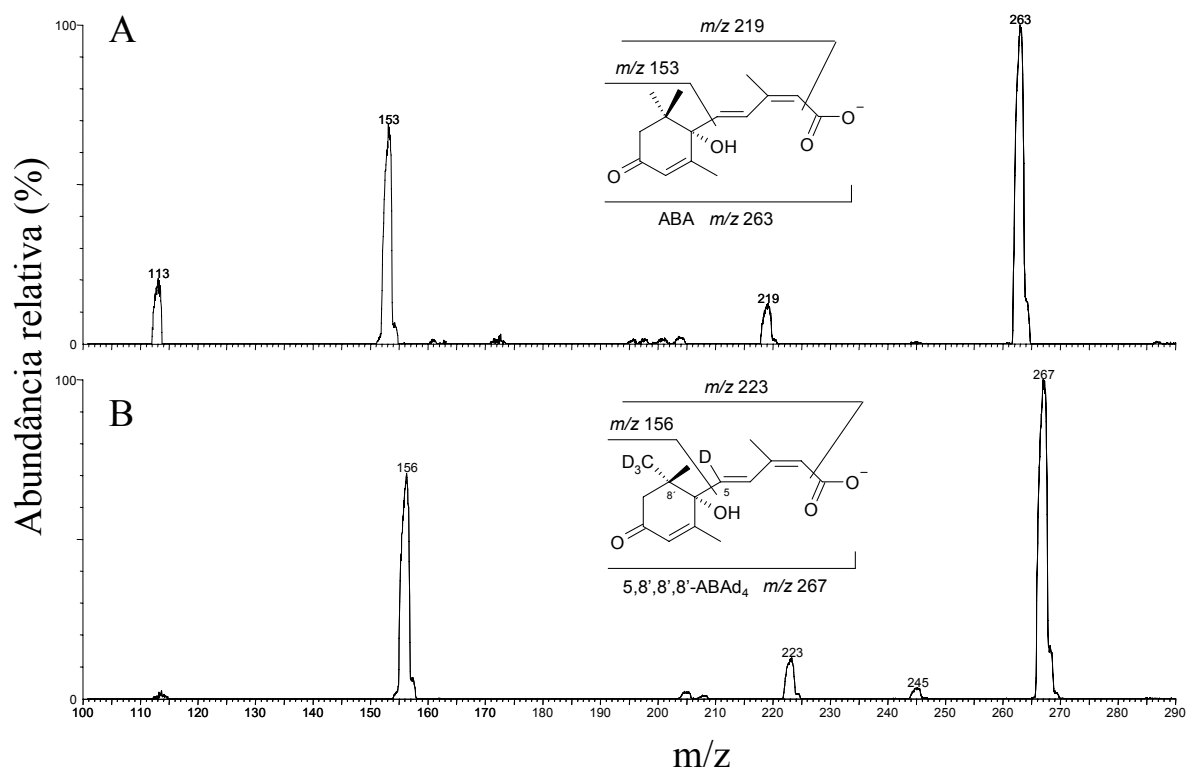


FIG. 5. Espectros de massas dos padrões ABA (A) e 5,8',8',8'-ABAd₄ (B) em 16 minutos, obtidos por HPLC/MS/ESI⁻ na faixa de massa com m/z de 100 a 300.

Na figura 6 tem-se os cromatogramas obtidos no modo de detecção MRM, monitorando as transições de massas dos padrões ABA (m/z 263→153) e 5,8',8',8'-ABAd₄ (m/z 267→156).

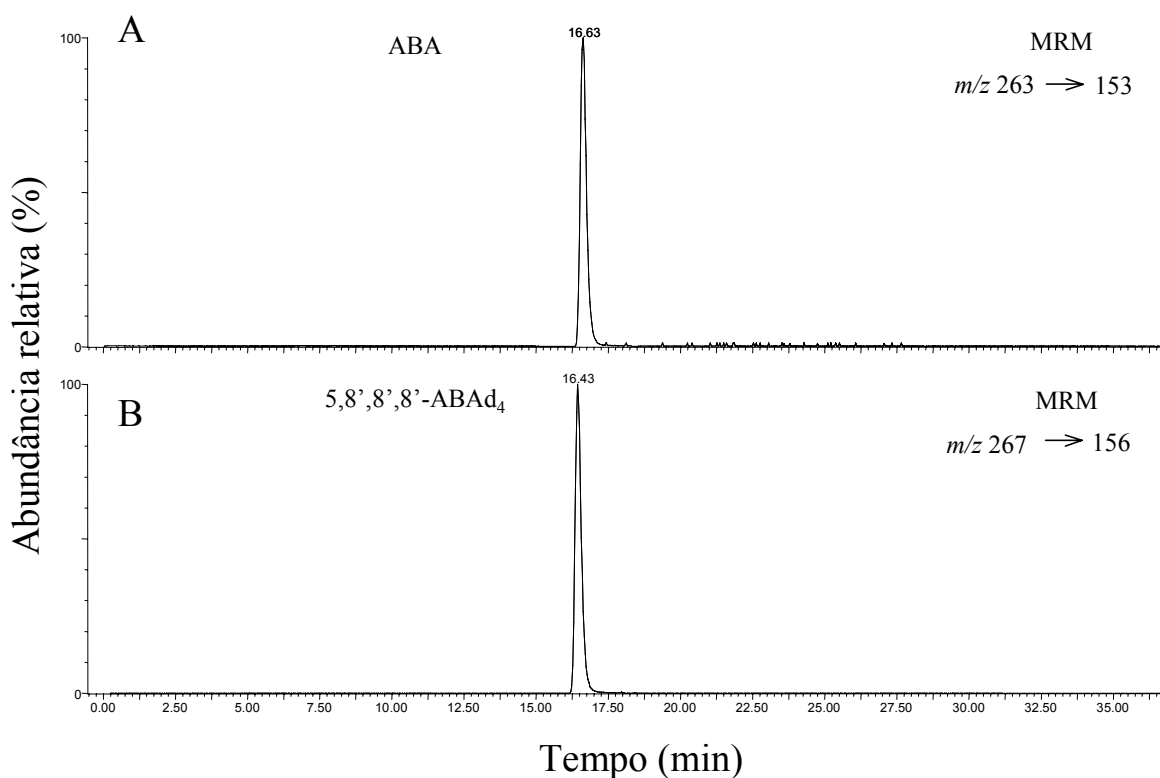


FIG. 6. Cromatogramas obtidos no modo de detecção MRM dos padrões ABA (A) e 5,8',8',8'-ABAd₄ (B).

Após a análise dos padrões ABA e 5,8',8',8'-ABAd₄ por HPLC/MS/MS, foi realizada a análise das amostras de folha e raiz de café. Como era esperado, tanto em condição controle (irrigadas) quanto em condição de déficit hídrico, as amostras de folha e raiz possuíam pequenas quantidades de ABA (nanogramas por grama de massa seca). Foi possível detectar e quantificar o ABA nas amostras utilizando-se uma curva de calibração, onde tanto as amostras quanto os padrões utilizados foram analisados por HPLC/MS/MS no modo MRM. A curva de calibração foi obtida através da razão entre as áreas dos picos de ABA e 5,8',8',8'-ABAd₄ (área de ABA/área de 5,8',8',8'-ABAd₄) versus diferentes concentrações de ABA. O cromatograma no modo MRM (FIG. 7) de uma amostra de folha de café possui a transição característica do ABA (m/z 263→153) e do padrão interno 5,8',8',8'-ABAd₄ (m/z 267→156), comprovando que a detecção por HPLC/MS/MS do ABA e do padrão interno adicionado na extração, foi eficiente e validou a metodologia para a quantificação da molécula de ABA.

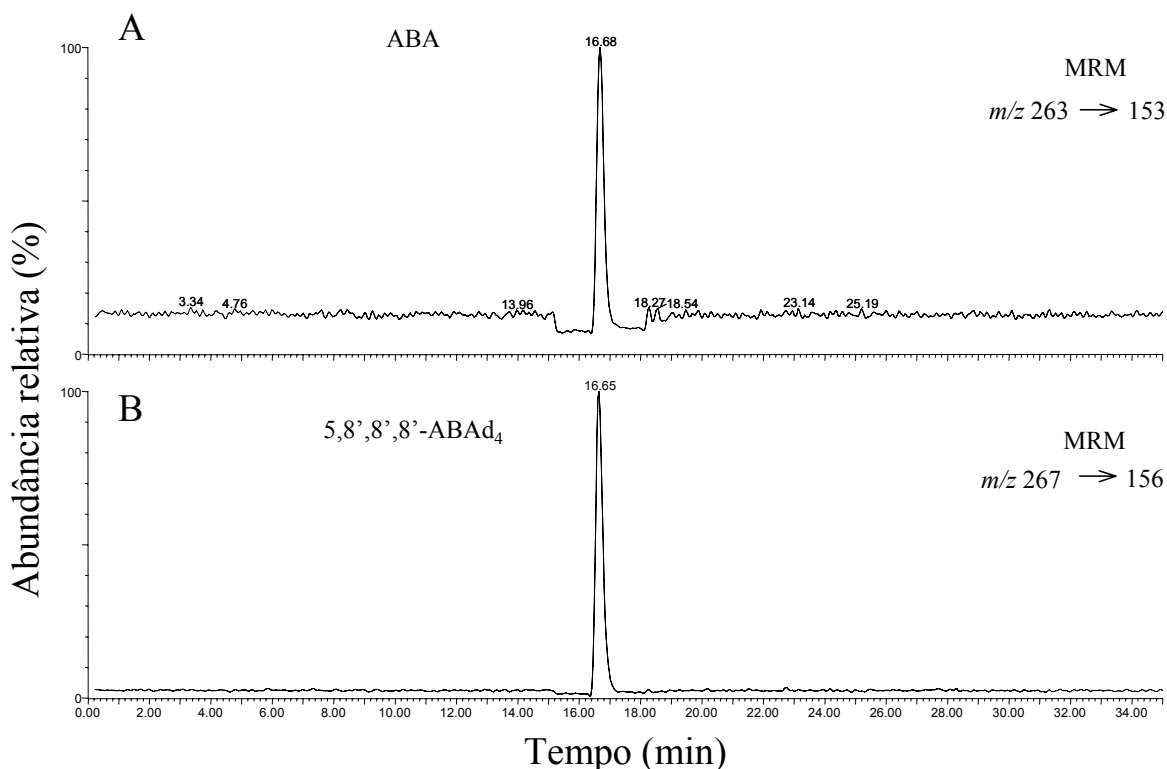


FIG. 7. Detecção de ABA em amostra de café. Cromatogramas obtidos no modo de detecção MRM do ABA (A) e do padrão interno 5,8',8'',8'''-ABAd₄ (B).

Quantificação de ABA nas folhas e raízes de *Coffea canephora*

Sob irrigação, não houve diferença nas concentrações foliares de ABA entre as diferentes combinações analisadas, situação que se repetiu a $\psi_{am} = -0,5$ MPa (Fig. 8). Aumentos nas concentrações foliares de ABA em resposta ao déficit hídrico somente foram observados quando ψ_{am} foi menor que $-1,0$ MPa.

Sob $\psi_{am} = -1,0$ e $-1,5$ MPa, foi possível observar maior concentração de ABA foliar nas plantas 120/120, 109/120 e 120/109, ao compararem-se essas plantas com a planta 109/109 (Fig. 8).

Em condições de déficit hídrico severo ($-3,0$ MPa), não houve diferença nas concentrações foliares de ABA entre as plantas tolerante (120) e sensível (109), bem como entre as plantas 109/120, 120/120/ e 109/109. Entretanto, a planta 120/109 apresentou maior concentração de ABA, quando comparadas às demais plantas (Fig. 8).

De modo geral, foi verificado que quanto menor ψ_{am} , maiores foram as concentrações de ABA foliar. Entretanto, não se observou diferença entre as plantas 120/120 e 109/120 submetidas aos $\psi_{am} = -1,5$ e $-3,0$ MPa (Fig. 8).

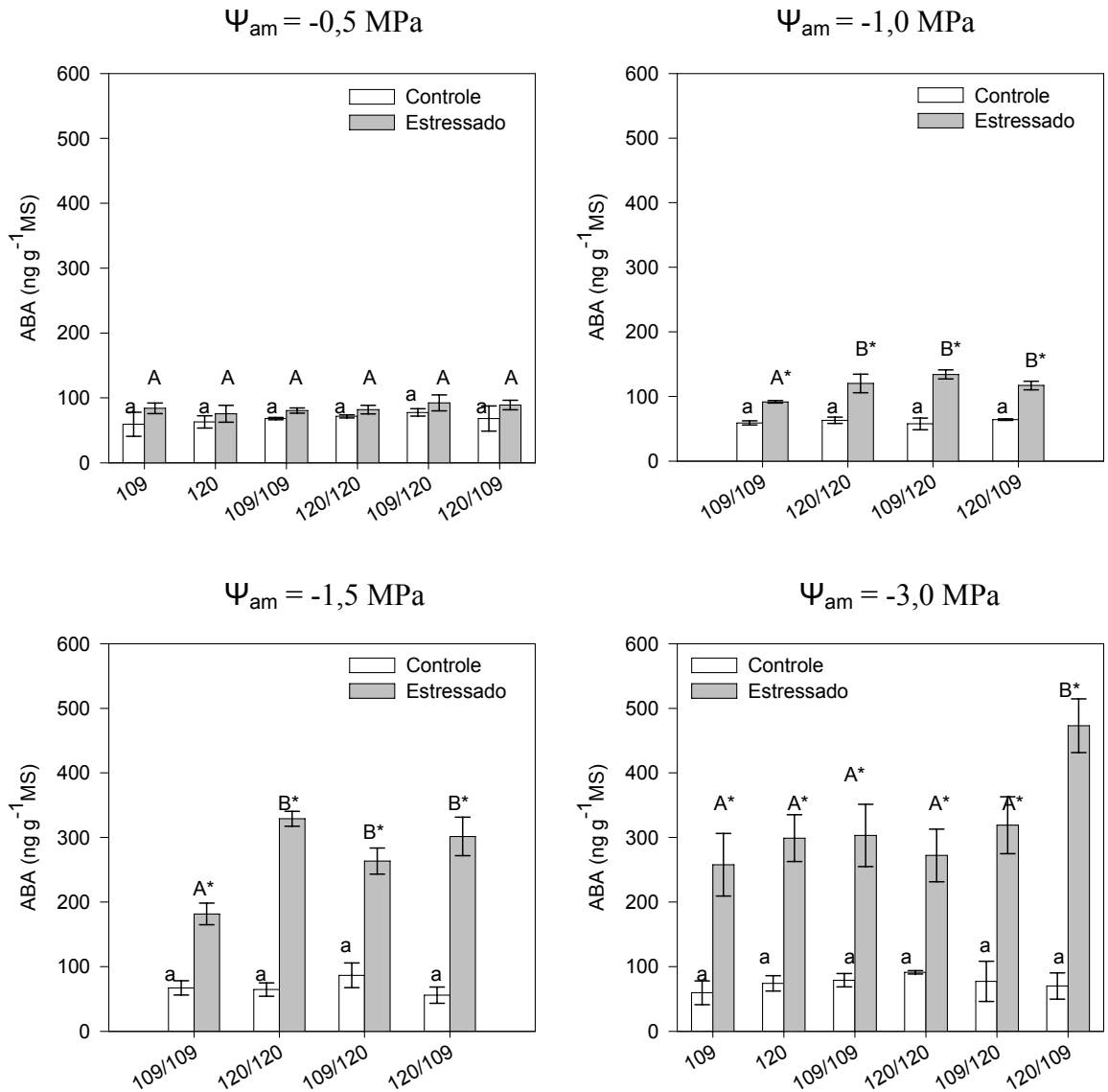


FIG. 8. Concentração foliar de ácido abscísico (ABA) em pés -franco e enxertias de *Coffea canephora* irrigados (colunas brancas) e submetidos ao déficit hídrico (colunas cinzas), $\Psi_{am} = -0,5, -1,0, -1,5$ e $-3,0$ MPa. Outros detalhes estatísticos conforme Fig. 2.

A concentração de ABA nas raízes, sob de déficit hídrico severo ($-3,0$ MPa) teve um aumento de aproximadamente 70 % em todas as plantas, quando comparadas às respectivas plantas-controle (Fig. 9). Independentemente do déficit hídrico, as concentrações de ABA foram maiores

nas raízes das plantas 120, 120/120 e 109/120 quando comparados aos das plantas 109, 120/109 e 109/109 (Fig. 9). Observou-se, também, em todas as plantas, que as concentrações de ABA na raiz foram sempre maiores do que as da folha, independente dos regimes hídricos.

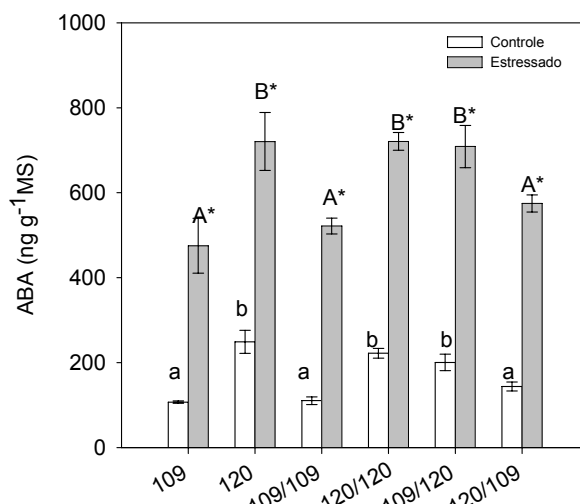


FIG. 9. Concentração de ácido abscísico (ABA) nas raízes de pés -franco e enxertias de *Coffea canephora* irrigados (colunas brancas) e submetidos a déficit hídrico (colunas cinzas), $\Psi_{am} = -3,0$ MPa. Outros detalhes estatísticos conforme Fig. 2.

6- Carboidratos e aminoácidos

Sob déficit hídrico moderado, não houve diferenças nas concentrações de glicose entre os pés-francos 120 e 109, bem como entre as enxertias 120/120 e 109/109 (Fig. 10a).

Sob déficit hídrico severo, o teor de glicose aumentou nas plantas 109, 109/109 e 109/120, fato não observado para 120, 120/120 e 120/109. Já quanto ao teor de frutose, não houve diferença entre as plantas estressadas e plantas-controle (Fig. 10a e 10b).

As concentrações de sacarose e amido foliar sofreram forte redução, tanto sob estresse hídrico moderado, quanto sob severo em todas os tratamentos, indistintamente. Os níveis de redução de sacarose foram, em média, de 38 % a $\Psi_{am} = -1,5$ MPa e 57 %, a $\Psi_{am} = -3,0$ MPa. Em ambos os potenciais foliares, a percentagem média de redução da concentração de amido foi de 70% (Fig. 10c e 11a).

Verificou-se, a $\Psi_{am} = -1,5$ MPa, que as razões amido:sacarose e hexoses:aminoácidos foram reduzidas nas plantas 120, 120/120, 109/120 e 120/109, fato não observado no clone 109 e 109/109 (Fig. 12). Já sob $-3,0$ MPa, a razão amido:sacarose permaneceu inalterada em todas as plantas, enquanto a razão hexoses:aminoácidos diminuiu nas plantas 120, 109/120 e 120/109 (Fig. 12).

A concentração de aminoácidos aumentou significativamente em todas as plantas, sob déficit hídrico moderado e severo, mais particularmente sob déficit moderado (Fig. 11b). Esse aumento foi mais pronunciado nas plantas 109 e 109/109, quando comparado ao das plantas 120 e 120/120. Entre as enxertias 120/109 e 109/120, sob déficit moderado, a concentração de aminoácidos foi maior na 120/109, que apresentou concentrações semelhantes às das plantas 109 e 109/109 (Fig. 11b).

A concentração de prolina não diferiu entre as plantas-controle, mas aumentou sob déficit hídrico moderado somente nas plantas 109, 109/109 e 109/120 (Fig. 11c). Sob déficit hídrico severo, as concentrações de prolina aumentaram em todas as plantas, com exceção da combinação de enxertia 120/109. Foi observado que as plantas 109 e 109/109 apresentaram as maiores concentrações de prolina e que houve um efeito do porta-enxerto 120, que reduziu as concentrações de prolina no enxerto 109 a valores semelhantes àqueles observados para as plantas 120, 120/120 e 120/109.

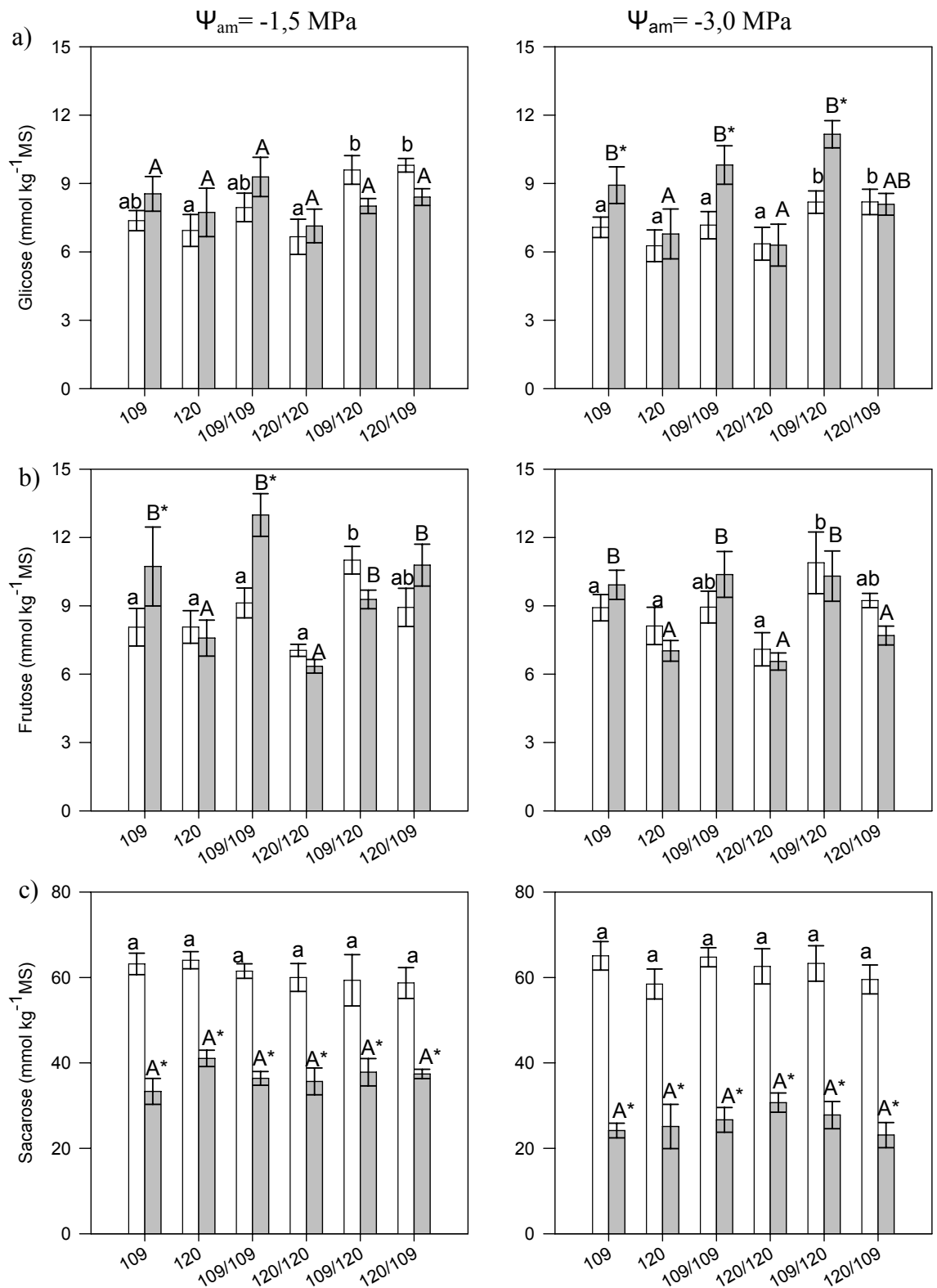


FIG. 10. Concentrações de glicose, frutose e sacarose, em folhas de pés-franco e enxertias de *Coffea canephora* irrigados (colunas brancas) e submetidos a déficit hídrico (colunas cinzas) moderado ($\Psi_{am} = -1,5$ MPa) e severo ($\Psi_{am} = -3,0$ MPa). Outros detalhes estatísticos conforme Fig. 2.

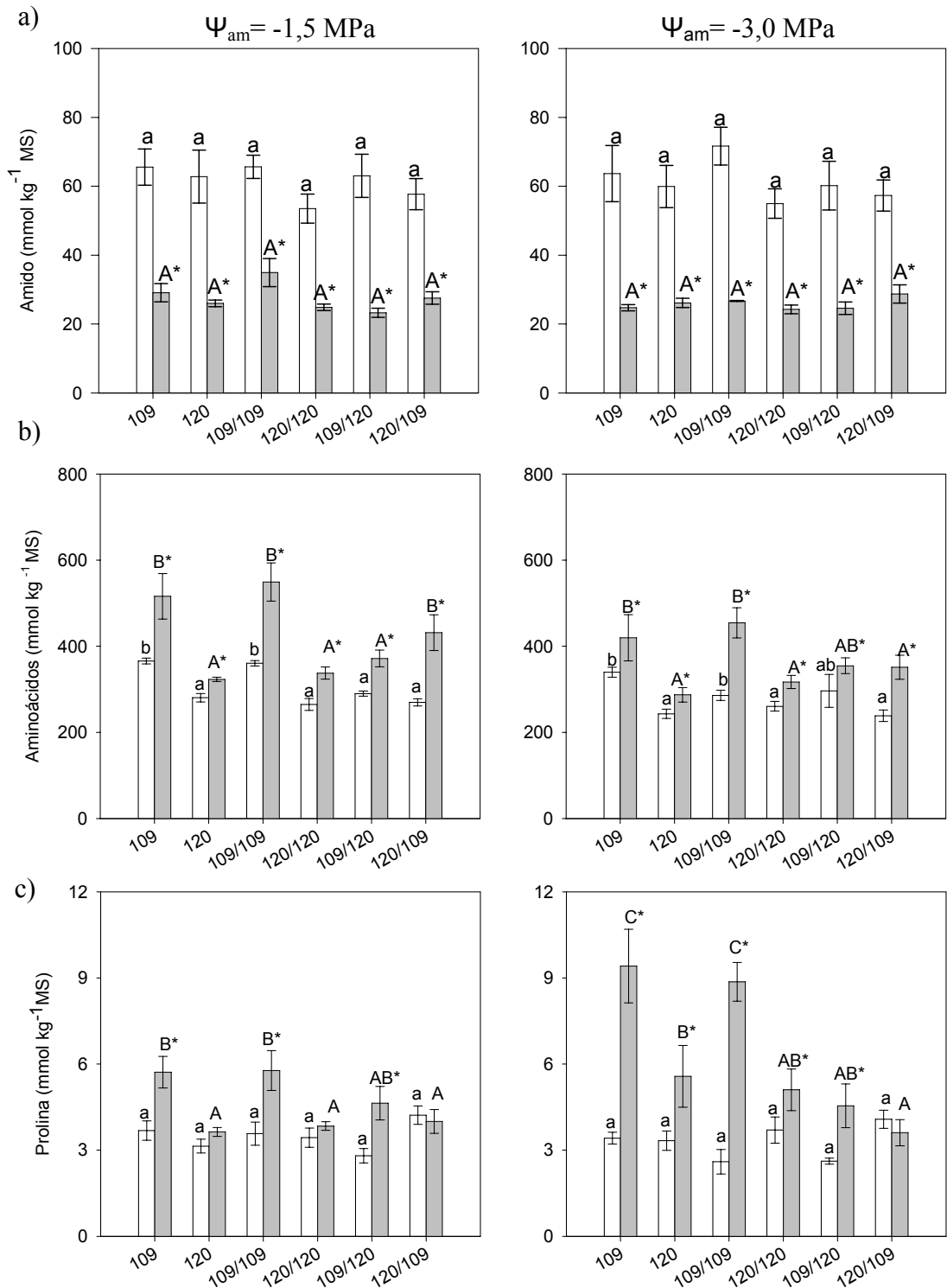


FIG. 11. Concentrações de amido, aminoácidos e prolina, em folhas de pés-franco e enxertias de *Coffea canephora* irrigados (colunas brancas) e submetidos a déficit hídrico (colunas cinzas) moderado ($\Psi_{am} = -1,5$ MPa) e severo ($\Psi_{am} = -3,0$ MPa). Outros detalhes estatísticos conforme Fig. 2

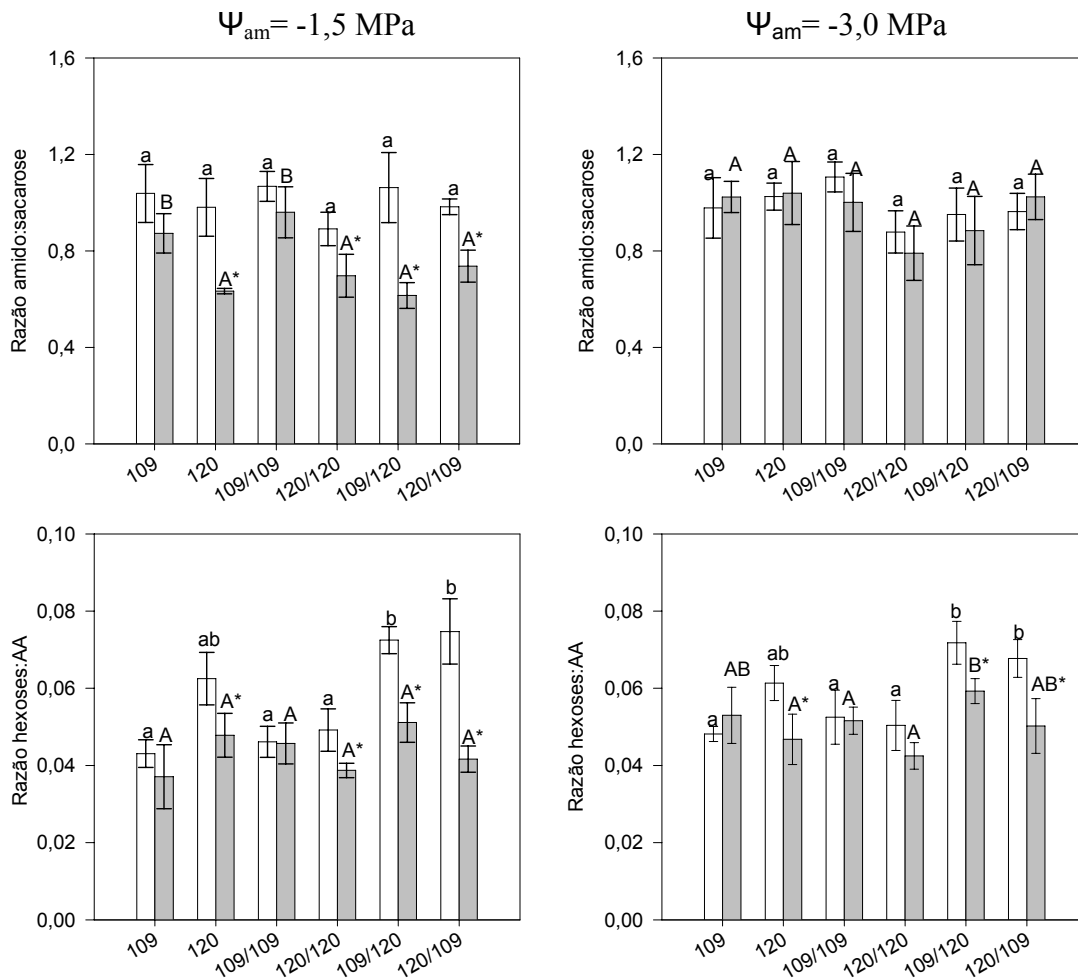


FIG. 12. Razões amido: sacarose e hexoses: aminoácidos, em folhas de pés-franco e enxertias de *Coffea canephora* irrigados (colunas brancas) e submetidos a déficit hídrico (colunas cinzas) moderado ($\Psi_{am} = -1,5$ MPa) e severo ($\Psi_{am} = -3,0$ MPa). Outros detalhes estatísticos conforme Fig. 2

7- Parâmetros de fluorescência da clorofila a e pigmentos fotossintéticos

Não foi observada diferença quanto aos parâmetros fotoquímicos e concentração de pigmentos fotossintéticos entre os pés-francos, auto-enxertias e combinações de enxertia, em condições irrigadas (Fig. 13). Sob déficit hídrico moderado e severo, não foram verificadas alterações na eficiência fotoquímica máxima do FSII (avaliada pela razão F_v/F_m) (Fig. 13a) e nos teores de pigmentos fotossintéticos (dados não apresentados).

Algumas alterações nos demais parâmetros fotoquímicos foram verificadas sob déficit hídrico, mas também não houve diferença entre as plantas. (Fig. 13). Sob déficit hídrico moderado e severo, não foram observadas alterações na razão F_v'/F_m' , enquanto q_p decresceu em média 24 % ($\Psi_{am}=-1,5$ MPa) e 30 % ($\Psi_{am}= -3,0$ MPa) (Fig. 13b e 13c). A redução em q_p esteve associada ao decréscimo em σ_{FSII} (24 %, $\Psi_{am}= -1,5$ e 36 %, $\Psi_{am}= -3,0$) (Fig. 13d). Entretanto, não houve alterações significativas em NPQ (Fig. 13e). Nas plantas submetidas ao déficit hídrico moderado e severo foram observados aumentos de 34% e 23% em P_E , respectivamente (Fig. 13f).

8- Estresse oxidativo

Em geral, pode-se observar menor extravasamento de eletrólitos em folhas do clone tolerante ao déficit hídrico, tanto a $\psi_{am} = -1,5$ quanto $-3,0$ MPa (Fig. 14). Sob déficit hídrico moderado, o extravasamento de eletrólitos aumentou nas folhas das plantas 109, 109/109 e 109/120, mas não nas folhas dos tratamentos 120, 120/120 e 120/109.

Sob déficit severo ($-3,0$ MPa), o extravasamento de eletrólitos aumentou significativamente em todas as plantas, particularmente nos pé-franco 109 e auto-enxertia 109/109 (~100% maior que nas plantas pé-franco 120 e auto-enxertia 120/120; Fig. 14). Ainda, pode-se observar que o porta-enxerto 120 reduziu o extravasamento de eletrólitos em folhas do enxerto 109 (plantas 109/120), quando comparado ao pé-franco 109. A tendência do mesmo efeito também pode ser observada sob déficit hídrico moderado, embora a diferença ainda não tenha sido significativa.

Sob irrigação adequada, não houve diferenças nas atividades das enzimas peroxidase do ascorbato (APX), dismutase do superóxido (SOD) e catalase (CAT) entre todas as plantas (Fig. 14).

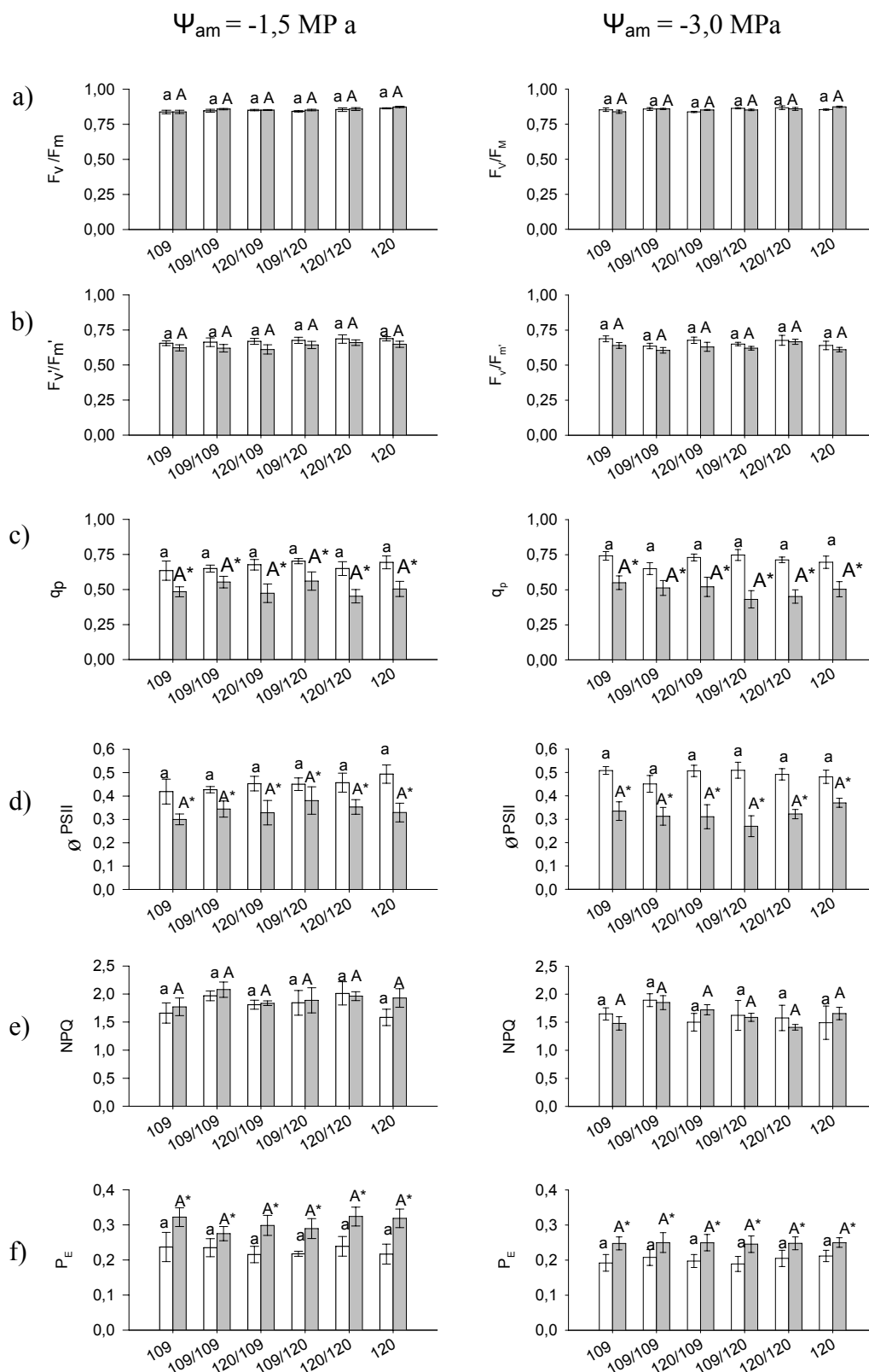


Fig. 13. Efeitos de níveis de déficit hídrico sobre a eficiência fotoquímica máxima do FSII – F_v/F_m (a), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII- F_v'/F_m' (b), coeficiente de extinção fotoquímica $-q_p$ (c), rendimento quântico do transporte de elétrons – \emptyset_{FSII} (d),

coeficiente de extinção não-fotoquímica- NPQ (e) e fração de energia absorvida não utilizada na fotoquímica nem dissipada termicamente - P_E (f) em folhas de pés- franco e enxertias de *Coffea canephora* irrigados (colunas brancas) e submetidos a déficit hídrico (colunas cinzas) moderado ($\Psi_{am} = -1,5$ MPa) e severo ($\Psi_{am} = -3,0$ MPa). Outros detalhes estatísticos conforme Fig. 2.

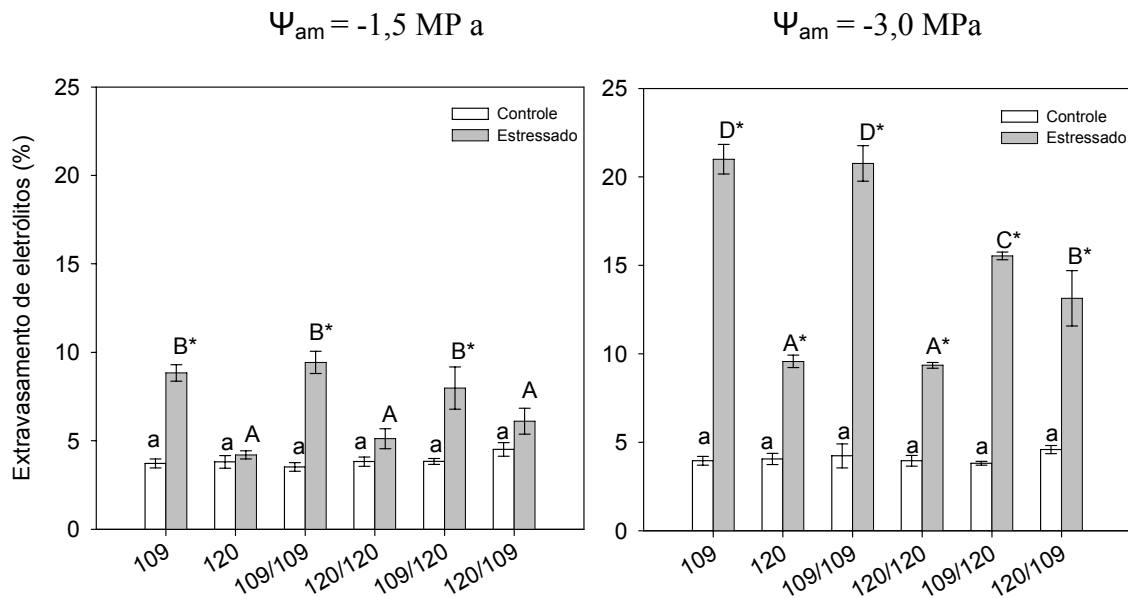


FIG. 14. Extravasamento de eletrólitos (%) em folhas de pés -franco e enxertias de *Coffea canephora* irrigados (colunas brancas) e submetidos a déficit hídrico (colunas cinzas) , moderado ($\Psi_{am} = -1,5$ MPa) e severo ($\Psi_{am} = -3,0$ MPa). Outros detalhes estatísticos conforme Fig. 2.

A $\psi_{am} = -1,5$ MPa, não houve alteração na atividade da APX e SOD, porém a atividade da CAT aumentou significativamente em todos os tratamentos. Sob déficit hídrico moderado houve uma tendência de maior atividade da CAT nas plantas 109 e 109/109 quando comparados às das demais (Fig. 15).

Em condições de déficit hídrico severo a atividade da APX aumentou somente nas plantas 109 (93%), 109/109 (77%) e 109/120 (65%), entretanto, a atividade da SOD e CAT aumentou significativamente em todas as plantas (Fig. 15). A atividade da SOD aumentou aproximadamente 75 % e não diferiu entre as plantas. O aumento da atividade da CAT foi em torno de 95 % nas plantas 109 e 109/109, e 65 % nas plantas 120, 120/120, 120/109 e 109/120 (Fig. 15).

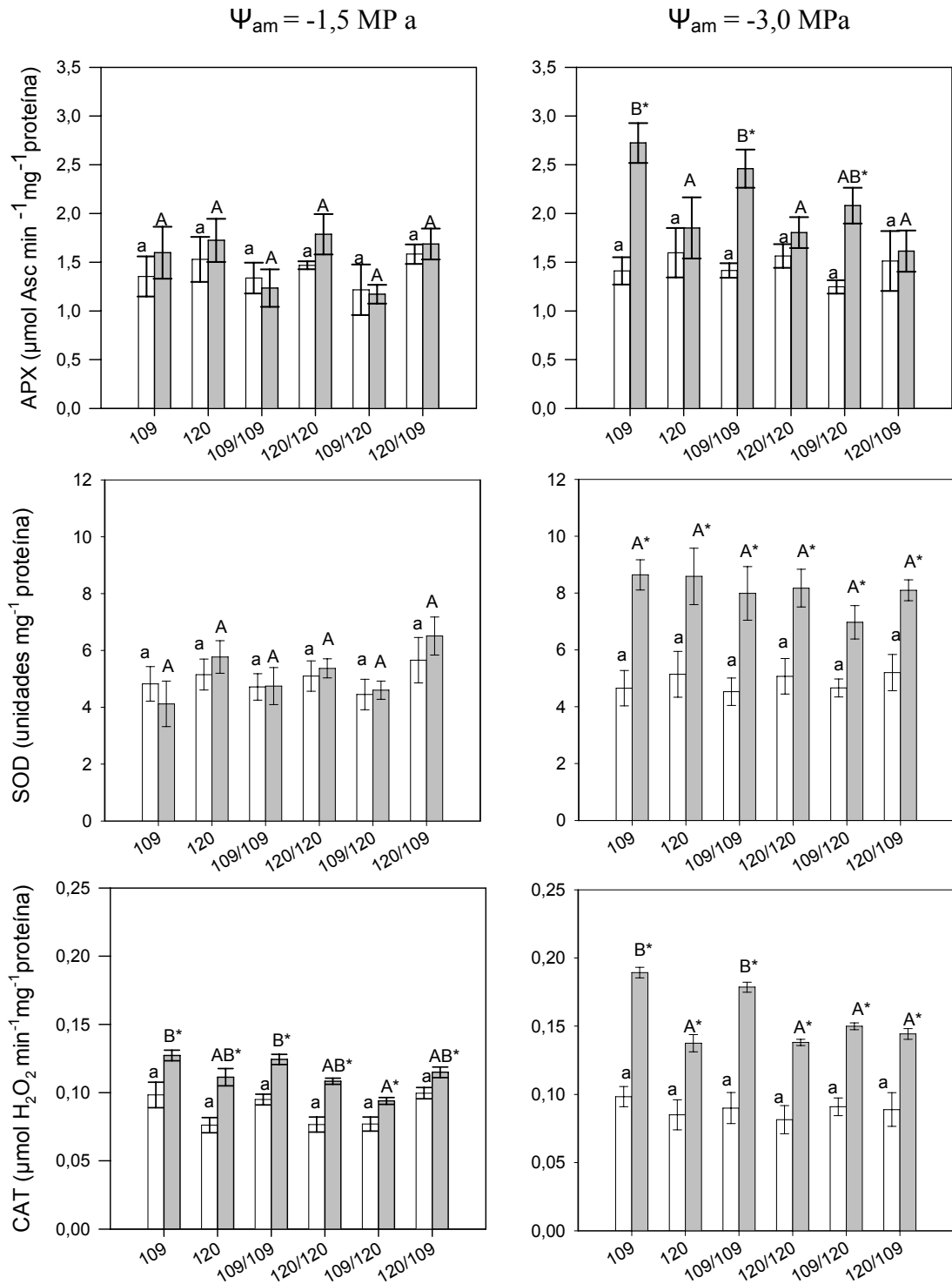


FIG. 15. Atividade de enzimas antioxidantes, ascorbato peroxidase-APX , superóxido dismutase -SOD e catalase-CAT, em folhas de pés-franco e enxertias de *Coffea canephora* irrigados (colunas brancas) e submetidos a déficit hídrico (colunas cinzas) moderado ($\Psi_{am} = -1,5 \text{ MPa}$) e severo ($\Psi_{am} = -3,0 \text{ MPa}$). Outros detalhes estatísticos conforme Fig. 2.

DISCUSSÃO

1- Efeito da enxertia e do déficit hídrico nos parâmetros de crescimento, trocas gasosas e ácido abscísico

Não foram verificados sintomas de incompatibilidade das combinações de enxertia, o que corrobora com a observação de que as características morfológicas, como comprimento do caule, diâmetro do caule e razão MSR/AF não diferem entre as plantas enxertadas e plantas pés-franco. Os dados sugerem que há uma interação entre enxerto e porta-enxerto que pode influenciar as características biométricas das plantas, visto que foi observado maior comprimento da raiz nas plantas cujo porta-enxerto é o clone 120, e que a enxertia 120/120 apresentou menores valores de acúmulo de massa seca na raiz e biomassa total. É comum a enxertia exercer um efeito inibitório no crescimento vegetativo e tem-se associado esse efeito à restrição do fluxo de água, minerais e reguladores de crescimento pelo sistema vascular entre enxerto e porta-enxerto (Jones, 1984; Simons, 1986; Soumelidou *et al.*, 1994b). Em concordância com estas observações, Atkinson *et al.* (2003), comparando porta-enxertos com diferenças na capacidade de produzir nanismo na macieira, observaram que as enxertias que produziam maior efeito de nanismo possuíam uma menor condutividade hidráulica. Dessa forma, é possível que a enxertia tenha ocasionado uma redução da condutância hidráulica do xilema nas plantas 120/120, resultando em uma redução do acúmulo de biomassa total da planta.

As plantas alcançaram o $\psi_{am} = -3,0$ MPa em diferentes dias, após a imposição do déficit hídrico, portanto as alterações de crescimento não foram completamente comparáveis entre as plantas estressadas. Além disso, os efeitos do déficit hídrico no crescimento das plantas não foram significativos devido ao curto período de imposição do déficit hídrico. De forma semelhante ao verificado por Pinheiro *et al.* (2005), o pé-franco 120 apresentou maior a tolerância ao déficit hídrico e um sistema radicular mais profundo que o pé-franco 109. As enxertias que possuíam o clone 120 como sistema radicular

também apresentaram maior tolerância ao déficit hídrico, a julgar-se pela redução mais lenta do ψ_{am} e pelo menor extravasamento de eletrólitos. Na enxertia 120/109 foi observado uma contribuição da parte aérea do clone 120 em retardar a queda do ψ_{am} . Estes efeitos não podem ser explicados por diferenças na área foliar, ou na razão massa raiz/área foliar. Em frutíferas, como macieira (Olien e Lakso, 1986, Policarpo *et al.*, 2000) e videira (Carboneau, 1985), porta-enxertos oriundos de genótipos tolerantes aumentam a tolerância à seca da parte aérea de outros genótipos, mas esse efeito depende da interação entre os genótipos utilizados. Em condições de campo, onde a disponibilidade da água do solo não foi limitante, a enxertia de cultivares de *C. arabica* em porta-enxerto de *C. canephora* cv. Apoatã contribuiu também para manutenção de um melhor status hídrico nas cultivares de *C. arabica*, fato atribuído especulativamente à arquitetura, tamanho e condutividade hidráulica das raízes de *C. canephora* (Fahl *et al.*, 2001).

A $\psi_{am} = -0,5$ MPa, as plantas tolerantes 120 e 120/120 apresentaram maior sensibilidade estomática do que as plantas sensíveis 109 e 109/109, pois g_s reduziu apenas nas plantas tolerantes. Além disso, as análises de g_s mostraram que o porta-enxerto 120 pode conferir menor g_s à parte aérea do clone 109, mas também que há uma contribuição da parte aérea do clone 120 no controle de g_s , visto que g_s da combinação 120/109 foi semelhante a g_s de outras plantas que possuíam o sistema radicular do clone 120. Em enxertias de macieira utilizando-se de diferentes porta-enxertos, tanto reduções quanto aumentos em g_s são observados quando comparadas com os pés-francos, sob déficit hídrico (Higgs e Jones, 1990). Alguns genótipos de porta-enxertos de videira também são capazes de modular A e g_s de folhas de genótipos enxertados (Lacono *et al.*, 1998). O efeito do porta-enxerto sobre g_s foi verificado também quando a variedade Catuaí (*C. arabica*) foi enxertada sobre café conilon (Tomaz *et al.*, 2006). Estes resultados contrastam com os experimentos de enxertia recíproca com os mutantes de girassol e tomate, deficientes em ABA, em que g_s dependeu somente do genótipo do enxerto (Fabrini *et al.*, 1995; Holbrook *et al.*, 2002).

Em potenciais iguais ou menores que -1,0 MPa, g_s reduziu em todas as plantas indistintamente. Estes resultados contrastam parcialmente com os resultados obtidos por Pinheiro *et al.* (2005), em que se observaram diferenças significativas entre os clones 109 e 120, sob potenciais iguais ou menores que -1,0 MPa. Tal discrepância pode estar associada a diferenças entre tamanhos de vaso ou interferência ambiental durante a realização das medições.

Sob déficit hídrico severo, reduções mais pronunciadas em A foram observadas nas plantas sensíveis 109 e 109/109 do que nas plantas tolerantes 120 e 120/120, apesar de não terem ocorrido diferenças em g_s e C_i/C_a . Em concordância com estas observações, foi possível verificar uma tendência de reduções menos pronunciadas em A nas enxertias 120/109 e 109/120. Visto que o fechamento estomático acarreta decréscimos proporcionalmente maiores à transpiração que à fotossíntese, a eficiência instantânea do uso da água foi maior nas plantas tolerantes e nas enxertias 120/109 e 109/120. Independentemente das plantas avaliadas sob déficit hídrico, as reduções em g_s ocorreram em maior extensão que as reduções em A , fato acompanhado por redução na razão C_i/C_a . Estes dados sugerem que a inibição fotossintética pode ter sido ocasionada principalmente devido ao fechamento dos estômatos. Estes resultados são consistentes com os apresentados por Praxedes *et al.* (2006). Entretanto, à medida que se intensifica o estresse, pode ocorrer também uma inibição não-estomática da fotossíntese, determinada possivelmente pelo comprometimento da regeneração da ribulose -1,5-bisfosfato e também por um decréscimo na atividade de carboxilação dessa enzima (DaMatta *et al.*, 2002b). Contudo, a severidade do déficit hídrico está intimamente relacionada à taxa de progressão do déficit, sendo que, quanto mais rápida menor a habilidade da planta para se aclimatar à seca (DaMatta e Ramalho, 2006). Sendo assim, os resultados podem indicar que naquelas plantas em que o déficit hídrico progrediu mais lentamente, pode ter ocorrido aclimação ao déficit hídrico e, portanto, os efeitos deletérios da seca podem ter sido minimizados, como, por exemplo, menor dano oxidativo, permitindo a maior manutenção parcial das taxas fotossintéticas.

Medidas instantâneas de trocas gasosas podem não refletir o desempenho da planta ao longo do tempo e, portanto, devem ser consideradas com cautela. Por outro lado, $\delta^{13}\text{C}$ na massa seca foliar pode ser tomada como um indicador sensível da capacidade fotossintética e do comportamento estomático integrados no tempo e, usualmente, é usada para expressar a E_A (Farquhar *et al.*, 1982). Conforme evidenciado pelos valores de $\delta^{13}\text{C}$, o déficit hídrico promoveu um aumento na $\delta^{13}\text{C}$ em todas as plantas, indicando que houve um aumento de E_A , reflexo de uma redução proporcionalmente maior em g_s que em A . Maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram associados com maior tolerância à seca, pois o pé-franco 120 e auto-enxertia 120/120 apresentaram maior $\delta^{13}\text{C}$ que o clone 109 e auto-enxertia 109/109. Nas plantas tolerantes, os maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$, associados a maior E_A , podem ter resultado do controle mais eficiente de g_s , acompanhada por uma redução menos pronunciada em A , quando comparados aos das plantas sensíveis ao déficit hídrico. Pinheiro *et al.* (2005) também evidenciaram que maior $\delta^{13}\text{C}$ foi verificado no clone 120, em relação ao clone 109, tanto em condições irrigadas quanto de déficit hídrico. Em condições de déficit hídrico no campo, DaMatta *et al.* (2003) verificaram que o clone 120 apresentou uma maior E_A associada a uma menor discriminação isotópica do carbono. Os maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$ verificados na enxertia 109/120 em relação 109/109 e 109 sugerem que há uma contribuição do porta-enxerto 120 em aumentar a E_A das folhas do clone 109, via maior fechamento estomático das folhas do clone 109, acompanhado de redução menos pronunciada em A . A partir destes resultados, pode-se inferir que algum sinal produzido nas raízes do clone 120 estaria promovendo redução em g_s . Já no caso da enxertia 120/109, os maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$ em relação 109/109 e 109, indicam que a parte aérea do 120 possui mecanismos que, independentemente do sistema radicular, seriam capazes de controlar, de alguma forma, g_s e A .

O controle de g_s , em condições de déficit hídrico, tem sido atribuído principalmente ao ABA (Zhang e Davies 1991; Borel *et al.*, 2001). Entretanto, apesar de ter ocorrido um aumento da concentração de ABA foliar sob $\psi_{am} = -$

1,0 e -1,5 MPa, que foi maior, principalmente, nas plantas 120/120, 109/120 do que nas plantas 109/109, não se observou uma associação clara entre alterações nas concentrações de ABA foliar e em g_s . Uma possível explicação para a ausência de associação entre os aumentos em ABA na folha e redução em g_s poderia ser a existência de uma sinalização hidráulica que poderia parcialmente controlar os movimentos dos estômatos, pois o café é uma espécie anisóidrica, caracterizada por um mecanismo de retroinibição da abertura estomática (Tardieu e Simmonneau, 1998). O fechamento estomático induzido pelo sinal hidráulico pode ocorrer em paralelo ou até mesmo desencadear uma redistribuição de ABA entre as células do mesofilo e do apoplasto. Esse sinal hidráulico está associado a uma mudança na tensão do xilema em plantas sob déficit hídrico, e pode modificar a sensibilidade ao ABA (Tardieu e Davies, 1992; Comstock, 2002) ou reduzir o crescimento dos brotos (Saab e Sharp, 1990) ou as trocas gasosas (Davies *et al.*, 1991; Tardieu e Davies *et al.*, 1992). Desta forma, as plantas poderiam responder a pequenas alterações no status hídrico do solo sem a necessidade de síntese adicional de ABA (Taiz e Zeiger, 2002). Ainda, durante as fases iniciais do déficit hídrico, o aumento do pH apoplástico, pode funcionar como um sinal das raízes promovendo o controle da resposta estomática ao ABA, quando ainda não ocorrem alterações detectáveis na concentração de ABA no xilema (Wilkinson e Davies, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998, Netting, 2000). Alternativamente, outras alterações também podem afetar a abertura estomática, como a redução na concentração de hormônios como citocininas (Badenoch-Jones *et al.* 1996) ou auxinas (Dunleavy e Ladley, 1995), nas concentrações iônicas (Ridolfi *et al.* 1996) ou na sensibilidade estomática ao ABA (Blatt, 2000; Hetherington, 2001; Schroeder *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2004; Bray 2002; Davies *et al.*, 2002; Prokic *et al.*, 2006;).

A maior concentração de ABA foliar nas plantas 120/120, 109/120, sob $\psi_{am} = -1,0$ e $-1,5$ MPa, sugere também que o ABA poderia estar sendo translocado do sistema radicular das raízes do clone 120 para a parte aérea, uma vez que as raízes deste clone possuem mais ABA na raiz do que as

plantas que possuem o sistema radicular 109. A influência da raiz em aumentar o teor de ABA da parte aérea foi verificada também em experimentos de enxertia recíproca em girassol e tomate (Fambrini *et al.*, 1995; Holbrook *et al.*, 2002).

Em condições de déficit hídrico severo, não houve diferenças quanto aos teores de ABA foliar entre as plantas tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico, o que pode ser atribuído, especulativamente, ao fato de que o déficit hídrico pode induzir também o catabolismo do ABA e quando a taxa de biossíntese é equivalente à taxa catabólica, a concentração de ABA pode ser aproximadamente constante, considerando-se que já não esteja mais havendo importação ou exportação de ou para, outras partes da planta (Ren *et al.*, 2006).

O ABA pode exercer efeito positivo no crescimento as raízes, mesmo em condições adequadas de irrigação, portanto, as maiores concentrações de ABA nas raízes oriundas do clone 120 (tolerante) podem contribuir para maior comprimento dessas raízes. Em plantas de milho, o comprimento da raiz é maior nas plantas selvagens (com níveis normais de ABA) do que nas plantas mutantes deficientes em ABA, mesmo quando o suprimento de água é abundante (Saab *et al.*, 1990; Spollen *et al.*, 2000). Efeito semelhante também tem sido observado para outras plantas (Sharp *et al.*, 2004).

2- Efeito da enxertia e do déficit hídrico nas concentrações de carboidratos, aminoácidos e prolina

Presume-se que a enxertia não alterou a alocação do carbono fixado para a síntese de compostos de reserva, utilização metabólica e síntese de compostos translocados, pois a enxertia não alterou as concentrações foliares de glicose, frutose, sacarose, amido, aminoácidos e prolina. O aumento da concentração de hexoses, principalmente glicose, foi mais evidente nas plantas que possuíam a parte aérea do clone mais sensível, mas não foi possível observar uma associação entre maior acúmulo de hexoses e maior redução da fotossíntese. Alguns autores têm proposto que o acúmulo de hexoses sob

déficit hídrico pode ser uma das causas da redução da fotossíntese (Paul e Driscoll, 1997), fato também não observado em café por Praxedes *et al.* (2006). A provável redução da força-dreno e a redução das taxas fotossintéticas das plantas submetidas ao déficit hídrico foram acompanhadas por redução nas concentrações de sacarose e amido de modo semelhante entre as plantas. Este resultado não concorda com maiores reduções no teor de sacarose observadas para o clone 109 por Praxedes *et al.* (2006) e Ronchi *et al.* (2005), e aumento na concentração de sacarose, sob $\psi_{am} = -3$ MPa (Praxedes *et al.*, 2006). Entretanto, a razão amido:sacarose foi reduzida somente nas plantas 120, 120/120, 109/120 e 120/109, o que pode ter sido devido a uma tendência observada de menores reduções no teor de sacarose nessas plantas. Por outro lado, a redução na concentração de amido é uma resposta bem caracterizada em plantas de café, tanto sob estresse hídrico moderado quanto severo (DaMatta *et al.*, 1997; Ronchi *et al.*, 2005; Praxedes *et al.*, 2006).

Tem sido proposto que o acúmulo de hexoses, aminoácidos e prolina pode contribuir para ajustamento osmótico, evitando maiores danos celulares associados à desidratação celular (Valliyodan e Nguyen, 2006). Entretanto, neste trabalho, o acúmulo de hexoses, aminoácidos e prolina, sob déficit hídrico, ocorreu em maiores proporções nas plantas sensíveis ao déficit hídrico (onde ocorreram maiores danos celulares) do que nas plantas tolerantes (menores danos celulares). Portanto, o acúmulo de prolina não foi associado a maior tolerância à seca, conforme observado em outras cultivares de café arábica e robusta (Vasudeva, 1981; Maestri *et al.*, 1995). Em alguns casos, a síntese de tais compostos sob déficit hídrico parece ser um indicador sensível do status hídrico foliar (Maestri *et al.*, 1995) e pode estar associada à injúria causada pela seca (Mazzafera e Teixeira, 1989). Neste caso, o acúmulo de prolina e aminoácidos pode ser mais uma consequência do déficit hídrico do que um mecanismo fisiológico, como ajustamento osmótico, envolvido nas respostas adaptativas ao déficit hídrico (Serraj e Sinclair, 2002).

3- Efeito da enxertia e do déficit hídrico no estresse oxidativo

Nenhuma combinação de enxertia apresentou respostas diferentes quanto aos parâmetros fotoquímicos e não foi possível fazer uma associação entre tolerância ao déficit hídrico e as respostas fotoquímicas. Conforme mostrado em outros trabalhos (DaMatta *et al.*, 2002a; Lima *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2004), a eficiência fotoquímica máxima do FSII (avaliada pela razão F_v/F_m) foi estável sob condições de seca, sugerindo que não houve danos fotoinibitórios. A redução em A não foi acompanhada por aumento em NPQ, e assim não ocorreu alteração na dissipação térmica induzida pela seca. Sob déficit hídrico, houve um aumento da "pressão de excitação" no PSII (conforme indicado por redução em q_p) o que significa que uma fração do centro de reação do PSII se encontrava em estado "fechado" durante a exposição à irradiância actínica, causando um decréscimo em ϕ_{PSII} , (Maxwell e Johnson, 2000). As reduções em ϕ_{PSII} paralelas a F_v/F_m inalterado estão provavelmente associados com a inibição do PSII durante a fotossíntese. Tal redução poderia representar uma capacidade de fotoproteção das plantas, que, em condições de déficit hídrico, ajustariam a taxa de transporte de elétrons à taxa de consumo de poder redutor (Ronchi *et al.*, 2005; Praxedes *et al.*, 2006). A fração da energia absorvida não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente aumentou em condições de estresse. Essa fração de energia pode reduzir o oxigênio molecular, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).

O extravasamento de eletrólitos a $\psi_{am} = -1,5$ MPa parece ter sido associado a características do genótipo da parte aérea, uma vez que o extravasamento de eletrólitos aumentou nas folhas das plantas 109, 109/109 e 109/120 e não aumentou nas folhas das plantas 120, 120/120 e 120/109. Entretanto, em geral, as atividades das enzimas APX, SOD e CAT, sob condições de déficit hídrico moderado, não diferiram entre os tratamentos, e somente a atividade da CAT aumentou naquelas condições. Portanto, desde que a CAT é localizada principalmente nos peroxissomos, o aumento da

atividade da CAT pode ser um indício de aumento da fotorrespiração (Willekens *et al.*, 1997).

Sob déficit hídrico severo, aumento do extravasamento de eletrólitos ocorrido em todas as plantas foi acompanhado por um acréscimo na atividade de todas as enzimas analisadas, porém tanto o extravasamento quanto as atividades da CAT e APX foram mais intensos nas plantas sensíveis 109 e 109/109, conforme observado por Lima *et al.* (2002). Os resultados obtidos para as atividades da SOD e APX, mas não para CAT, estão de acordo com Pinheiro *et al.* (2004). Tais diferenças podem estar associadas às diferenças nas condições fisiológicas da planta e na integração de diferentes estímulos ambientais e de desenvolvimento (Reddy *et al.*, 2004).

Sob déficit severo, foi possível verificar que há uma contribuição do sistema radicular do clone 120 em reduzir o estresse oxidativo em folhas, pois nas plantas 109/120, o extravasamento de eletrólitos e a atividade da CAT foram menores do que nas plantas 109 e 109/109. Os dados também sugerem que há uma contribuição da parte aérea do clone 120 na redução do estresse oxidativo, pois o extravasamento de eletrólitos e as atividades da APX e CAT foram menores nas plantas 120/109 do que nas plantas 109 e 109/109.

De modo geral, o clone 120 apresentou uma maior tolerância ao estresse oxidativo, pois uma adaptação do sistema anti-oxidativo parece ter contribuído para minimizar danos oxidativos como aquele que acompanha o extravasamento de eletrólitos. Em contrapartida, o clone 109 foi menos tolerante ao estresse oxidativo, visto que as alterações nas atividades das enzimas não foram suficientes para controlar os danos celulares. O efeito do porta-enxerto 120 em retardar o estresse, possivelmente contribuiu para que adaptações do mecanismo anti-oxidativo diminuísse também os efeitos oxidativos na parte aérea. Um possível mecanismo para explicar este efeito envolveria a maior concentração de ABA nas raízes e folhas (estresse hídrico moderado) do clone tolerante. Aumentos nas concentrações de ABA aumentam significativamente a concentração de H_2O_2 na folha, o qual é um conhecido indutor da expressão de várias enzimas antioxidativas (Kwak *et al.*,

2003; Hu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006), e sob déficit hídrico o ABA induz a expressão de genes que codificam várias enzimas antioxidantes (Guan *et al.*, 2000; Jiang e Zhang, 2001; 2002a, 2002b, 2003; Hu *et al.*, 2005).

CONCLUSÕES

A utilização da enxertia recíproca entre dois genótipos contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico permitiu observar que há uma contribuição do sistema radicular do clone 120 em retardar o déficit hídrico na parte aérea 109. Foi possível observar também que, assim como o sistema radicular, a parte aérea do clone 120 também contribui para a tolerância à seca, pois a utilização do porta-enxerto sensível não tornou a parte aérea 120 tão sensível à seca quanto o clone 109. A parte aérea e o sistema radicular do clone 120 são capazes de, principalmente, influenciar a condutância estomática, a concentração de ABA foliar e minimizar danos oxidativos nas folhas. A capacidade do porta-enxerto 120 em retardar o início de déficits foliares severos ocorreu simultaneamente com um fechamento estomático mais precoce e uma maior razão de composição isotópica do carbono, salientando a importância do comportamento estomático para a tolerância a seca em café. Embora não tenha sido possível observar uma associação entre maiores concentrações de ABA e menor g_s , foi possível verificar que o clone 120 e as enxertias em que o clone 120 era utilizado como porta-enxerto apresentaram maior concentração de ABA nas folhas e raízes, sob déficit hídrico moderado e severo, respectivamente. Estes resultados sugerem que o ABA pode estar envolvido nos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico e que há a possibilidade de ocorrência de outros sinais que influenciam g_s , como a mudança no pH ou alterações na condutividade hidráulica do xilema. Assim, o clone tolerante produz um sinal radicular que é acompanhado por um retardo da desidratação celular e um menor estresse oxidativo nas folhas sob déficit hídrico, permitindo melhor adaptação das folhas, o que pode ser deduzido pela maior taxa de fotossíntese líquida sob déficit hídrico severo. Em suma, estes dados indicam a perspectiva de utilização de porta-enxertos de clones tolerantes para aumentar a tolerância à seca de genótipos mais sensíveis. As pesquisas devem continuar sendo realizadas estendendo a análise deste efeito a outros genótipos de forma a

verificar a existência de especificidade da interação entre diferentes porta-enxertos e enxertos. Essas avaliações devem ser realizadas a campo em diferentes condições climatológicas de cultivo e sob diferentes intensidades de déficit hídrico natural. Dessa maneira, tornar-se-á possível verificar a variabilidade dos diferentes mecanismos fisiológicos da tolerância à seca. Isso é importante, para que, em um programa de melhoramento, tais avaliações fisiológicas possam ter importante valor na seleção genética e na seleção de combinações de enxertia que sejam efetivas em melhorar a tolerância à seca no cafeeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 50, 601-639.
- Atkinson, C.J., Else, M.A., Taylor, L., Dover, C.J., 2003. Root and stem hydraulic conductivity as determinants of growth potential in grafted trees of apple (*Malus pumila* Mill.). *Journal of Experimental Botany*. 54, 1221-1229.
- Atkinson, C.J., Policarpo, M., Webster, A.D., Kingswell, G., 2000. Drought tolerance of clonal *Malus* determined from measurements of stomatal conductance and leaf water potential. *Tree Physiology*. 20, 557-563.
- Badenoch-Jones, J., Parker, C.W., Letham, D.S., Singh, S., 1996. Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in derooted seedlings of oat and wheat. *Plant, Cell and Environment*. 19, 504-516.
- Barros, R.S., Maestri, M., Vieira, M., Braga-Filho, L.J., 1973. Determinação de área de folhas do café (*Coffea arabica* L. cv. 'Bourbon Amarelo'). *Revista Ceres, Viçosa*, 20, 44-52.
- Bates, L., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39, 205-207.
- Blatt, M.R., 2000. Ca²⁺ signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Current Opinion in Plant Biology*. 3, 196-204.
- Borel, C., Audran, C., Frey, A., Marion-Poll, A., Tardieu, F., Simonneau, T., 2001. *N. plumbaginifolia* zeaxanthin epoxidase transgenic lines have unaltered baseline ABA accumulations in roots and xylem sap, but contrasting sensitivities of ABA accumulation to water deficit. *Journal of Experimental Botany*. 52, 427- 434.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Bray, E.A., 1993. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiology*. 3, 1035-1040.
- Bray, E.A., 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during water deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant, Cell and Environment*. 25, 153-161.

- Carbonneau, A., 1985. The early selection of grapevine rootstocks for resistance to drought conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36, 195-198.
- Castle, W.S., 1995. Rootstock as a fruit quality factor in citrus and deciduous tree crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 23, 383 - 394.
- Chaves, M.M., 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*. 42, 1-16.
- Comstock, J., 2002. Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany*. 53, 195-200.
- Costa, W.M., Gonçalves, W., Fazuoli, L.C., 1991. Produção de café Mundo Novo em porta-enxerto de *Coffea canephora*, em área infestada com *Meloidogyne incognita* raça 1. *Nematologia Brasileira*. 15, 43-50.
- Cutler, A.J., and Krochko, J.E., 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*. 4, 472-478.
- DaMatta F.M., Loos R.A., Silva E.A., Loureiro, M.E., 2002. Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*. 159, 975-981.
- DaMatta F.M., Maestri M., Barros R.S., 1997. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica*. 34, 257-264.
- DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Pinheiro, H.A., Ducatti, C., Loureiro, M.E., 2003. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Science*. 164, 111-117.
- DaMatta, F.M., Ramalho, J.D.C, 2006. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal Plant Physiology*. 18, 55-81.
- DaMatta, F.M., Rena, A.B., 2002. Relações hídricas no cafeeiro. In: *Palestra I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Embrapa café, Brasília, 9-44.
- DaMatta, F.M., Silveira, J.S.M., Ducatti, C., Loureiro, M.E, 2000. Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: *Resumo expandido, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Embrapa Café, Brasília, 907 - 910.
- Davies, W.J., Wilkinson, S., Loveys, B., 2002. Stomatal control by chemical signaling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytologist*. 153, 449-460.

- Davies, W.J., Zhang, J.H., 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42, 55–76.
- Dunleavy, P.J., Ladley, P.D., 1995. Stomatal responses of *Vicia faba* L. to indole acetic acid and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*. 45, 903-907.
- Fahl, J. I., Carreli, M. L. C., Gallo, P. B., Da Costa, W. M., Novo, M. doC. deS. S., 1998. Enxertia de *Coffea arabica* sobre progênies de *Coffea canephora* e de *C. congensis* no crescimento, nutrição mineral e produção. *Bragantia*. 57, 297-312.
- Fahl, J.I., Carelli, M.L.C., Menezes, H.C., Gallo, P.B., Trivelin, P.C.O., 2001. Gas exchange, growth, yield and beverage quality of *Coffea arabica* cultivars grafted on to *C. canephora* and *C. congensis*. *Experimental Agriculture*. 37, 241-252.
- Fahl, J. I., Carreli, M. L. C., 1985. Estudo fisiológico da interação enxerto e porta-enxerto em plantas de café. In: Congresso Brasileiro De Pesquisas Cafeeiras, 12., 1985, Caxambu. Resumos... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1985. 115-117.
- Fambrini, M., Vernieri, P., Toncelli, M.L., Rossi, V.D., Pugliesi, C., 1995. Characterization of a wilted sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutant. III. Phenotypic interaction in reciprocal grafts from wilted mutant and wild-type plants. *Journal of Experimental Botany*. 46, 525–530.
- Fan, L.M., Zhao, Z., Assmann, S.M., 2004. Guard cells: a dynamic signaling model. *Current Opinion in Plant Biology*. 7, 537-546.
- Farquhar, G.D., Ehleringer J.R., Hubick, K.T., 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review Plant Physiology Plant Biology*. 40, 503-537
- Fazuoli, L., Costa, W. M., Borboletto, N. 1983. Efeito do porta-enxerto LiC 2258 de *Coffea canephora*, resistente a *Meloidogyne incognita*, no desenvolvimento e produção inicial de dois cultivares de *Coffea arabica*. In: Congresso Brasileiro De Pesquisas Cafeeiras, 10, 1983, Poços de Caldas. Resumos... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 113-115.
- Ferrão, R.G., Fonseca, A.F.A., Ferrão, M.A.G., Santos, L.P. 2000a. Avaliação de clones elites de café Conilon em condição de estresse hídrico no estado do Espírito Santo. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Embrapa café, Brasília, 402 - 404.
- Ferrão, R.G., Fonseca, A.F.A., Ferrão, M.A.G., Santos, L.P. 2000b. Comportamento de clones elites de café Conilon em condições de alta

- tecnologia no estado do Espírito Santo. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Embrapa café, Brasília, 769 -771.
- Ferreira, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual Da Região Brasileira Da Sociedade Internacional De Biometria, 45., 2000, São Carlos. Anais... São Carlos: UFSCar, 2000. 255-258.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59, 309-314.
- Guan, L.M., Zhao, J., Scandalio, J.G., 2000. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal*. 22, 87-95.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., Geneve, R. L., 2002. *Plant propagation: principles and practices*. 7. ed. Upper Sanddle River: Prentice Hall. 849 p.
- Havir, E.A.; McHale, N.A. 1989. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana glauca* by high CO₂. *Plant Physiology*. 89, 952-957
- Hetherington, A.M., 2001. Guard cell signalling. *Cell*. 107, 711-714.
- Higgs, K. H., Jones, H.G., 1990. Response of apple rootstocks to irrigation in south-east. England. *Journal Horticultural Science*. 65, 129-141.
- Holbrook, N.M., Shashidhar, V.R., James, R.A., Munns, R, 2002. Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *Journal of Experimental Botany*. 373, 1503-1514.
- Hoffmann, A., Chalfun, N. N. J., Antunes, L. E. C., Ramos, J. D., Pasqual, M., Silva, C. R. De R., 1996. *Propagação de plantas frutíferas*. Lavras:UFLA. 319 p.
- Hu, X., Jiang, M., Zhang, A., Lu, J., 2005. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta*. 223, 57–68.
- Hu, X., Zhang, A., Zhang, J., Jiang, M., 2006. Abscisic Acid is a Key Inducer of Hydrogen Peroxide Production in Leaves of Maize Plants Exposed to Water Stress. *Plant Cell Physiology*. 47, 1484–1495.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., 2000. A stress inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in

- abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiology*. 123, 553–562.
- Jiang, M., Zhang, J., 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiology*. 42, 1265–1273.
- Jiang, M., Zhang, J., 2002a. Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta*. 215, 1022–1030.
- Jiang, M., Zhang, J., 2002b. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal Experimental Botany*. 53, 2401–2410.
- Jiang, M., Zhang, J., 2003. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Environment*. 26, 929–939.
- Jones, O.P., 1986. Endogenous growth regulators and rootstock/scion interactions in apple and cherry trees. *Acta Horticulturae*. 179, 177-183.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G. and Schroeder, J.I., 2003. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*. 22, 2623–2633.
- Lacono, F., Buccela, A., Peterlunger, E., 1998. Water stress and rootstock influence on leaf gas exchange of grafted and ungrafted grapevines. *Scientia Horticulture*. 75, 27-39.
- Lawlor, D.H., Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*. 25, 275-294.
- Lockard, R.G, Schneider, G.W., 1981. Stock and scion growth relationship and the dwarfing mechanism in apple. *Horticultural Reviews*. 2, 315 - 375
- Lima, A.L.S., DaMatta, F.M., Pinheiro, H.A., Totola, M.R., Loureiro, M.E., 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 47, 239-247.
- Liu, X., Baird, W., 2003. Differential Expression of Genes Regulated in Response to Drought or Salinity Stress in Sunflower. *Crop Science*. 43, 678-687

- Maestri, M., DaMatta, F.M., Regazzi, A.J., Barros, R.S., 1995. Accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in mature leaves of water stressed coffee plants (*Coffea arabica* and *C. canephora*). *Journal Horticulturae Science*. 70, 229-233.
- Mascher, R., Lippmann, b., Holzinger, s., Bergmann, H., 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science*. 163, 961-969.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51, 659-668.
- Mazzafera, P., Teixeira, J.P.F., 1989. Prolina em cafeeiros submetidos a déficit hídrico. *Turrialba* 39:305-313.
- Medina, C.L., Machado, E.C., Gomes, deM.dA., 1999. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira 'valência' sob deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 11, 29-34.
- Moraes, F.R., 1963. Meio ambiente e práticas culturais. In: *Cultura e Adubação do Cafeeiro* 77-126. Instituto Brasileiro da Potassa, São Paulo.
- Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.
- Nambara, E., Marion-Poll, A., 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biology*. 56, 165–185.
- Netting, A.G., 2000. pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations. *Journal of Experimental Botany*. 51, 147–158.
- Noctor, G., Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review Plant Physiology Molecular Biology*. 49, 249-279.
- ODA, M., 1995. New grafting methods for fruit-bearing vegetables in Japan. *Japanese. A.R.Q.29*, 187-194.
- Olien, W.C., Lakso, A.N., 1986. Effect of rootstock on apple (*Malus domestica*) tree water relations. *Physiologia Plantarum*. 67, 421-430.

- Paul, M.J., Driscoll, S.P., 1997. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source sink-imbalance. *Plant, Cell, and Environment*. 20, 110-116.
- 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.
- Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Loureiro, M.E., Ducatti, C., 2005. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany*. 96, 101-108.
- Policarpo, C.J., Webster, A.D., Kingswell, G., 2000. Drought tolerance of clonal *Malus* determined from measurements of stomatal conductance and leaf water potential. *Tree Physiology*. 20, 557-563.
- Praxedes, S.C., DaMatta, F.M., Loureiro, M.E., Ferrão, M.A.G., Cordeiro, A.T., 2006. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*. 56, 263-273.
- Prokic, L., Jovanovic, Z., McAinsh, M.R., Vucinic, Z., Stikic, R., 2006. Species-dependent changes in stomatal sensitivity to abscisic acid mediated by external pH. *Journal of Experimental Botany*. 57, 675-683.
- Qin, X., Zeevaart, J.A., 1999. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings. National Academy Science. USA*. 96, 15354-15361.
- Ramos, L.S., Carvalho, A., 1997. Shoot and root evaluations on seedlings from *Coffea* genotypes. *Bragantia*. 56, 59-68
- 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.
- Ren, H., Gao, Z., Chen, L., Wei, K., Liu, J., Fan, Y., Davies, W.J., Jia, W., Zhang, J., 2006. Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water deficit. *Journal of Experimental Botany*. 18, 1-9.
- Ribeiro, A.C., Guimarães, P.T.G., Alvarez, V.H., 1999. Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais, 5ª Aproximação, Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais - CFSEMG, Viçosa – MG.

- Ridolfi, M., Fauveau, M.L., Label, P., Garrec, J.P., Dreyer, E., 1996. Responses to water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koreana trichocarpa* cv. 'Peace'). I. Stomatal function. *New Phytologist* .134, 445-454.
- Ronchi, C.P., Caten, A.T., Moraes, G.A.B.K., Batista, K.D., Chaves, A.R.M., DaMatta, F.M., 2005. Efeitos de taxas de imposição e severidade do déficit hídrico sobre o metabolismo de carboidratos em folhas de *Coffea canephora*. In: III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Embrapa Café, Brasília (extended abstract on CD-ROM).
- Ross, A.R.S., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Feurtado, J.A., Kermode, A.R., Nelson, K., Zhou, R., Abrams, S.R., 2004. Determination of endogenous and supplied deuterated abscisic acid in plant tissues by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Analytical biochemistry*. 329, 324-333.
- Saab, I. N., Sharp, R.E., Pritchard, J., Voetberg, G.S. 1990. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiology*. 93, 1329–1336.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., Gethyn, A.J., 2001. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*. 410, 327-330.
- Schwartz, S.H., Qin, X., Zeevaart, J.A.D., 2003. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology* 131, 1591-1601.
- Seo, M., and Koshiba, T., 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Science*. 7, 41–48.
- Serraj, E., Sinclair, T.R., 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment*. 25, 333-341.
- Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, L.G., Spollen, W.G., Springer, G.K., Bohnert, H.J., Nhuyen, H.T., 2004. Root Growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*. 55, 2343-2351.
- Simons, R.K., 1986. Graft-union characteristics as related to dwarfing in apple (*Malus domestica* Borkh). *Acta Horticulturae*. 160, 57-66.

- Sorce, C., Massai, R., Picciarelli, P., Lorenzi, R., 2002. Hormonal relationships in xylem sap of grafted and ungrafted *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae*. 93, 333–342
- Soumelidou, K., Morris, D.A., Battey, N.H., Barnett, J.R., John, P., 1994. Auxin transport capacity in relation to the dwarfing effect of apple rootstocks. *Journal of Horticultural Science*. 69, 719-725.
- Souza, C.R., Maroco, J.P., dos Santos, T.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C.M., Pereira, J.S., Chaves, M.M., 2005. Impact of deficit irrigation on water use efficiency and carbon isotope composition ($\delta^{13}C$) of field-grown grapevines under Mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany*. 56, 2163-2172
- Spollen, W.G., LeNoble, M.E., Samuels, A.D., Bernstein, N., Sharp, R.E., 2000. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology* .122, 967–976.
- Stitt, M., Lilley, R.M.C., Gerhard, R., Heldt, H.W., 1989. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology*. 174, 518-552.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2004. *Fisiologia vegetal*. 3nd ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p.
- Tardieu, F., Davies, J.W., 1992. Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant Physiology*. 98, 540-545.
- Tardieu, F., Simonneau, T., 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany*. 49, 419-432.
- Thompson, J.E., Legge, R.L., Barber, R.F., 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*. 105, 317-344.
- Tomaz, M. A., Sakiyama, N. S., Damatta, F. M., Martinez, H. P., Cruz, C. D., Pereira, A.A., 2006. Efeito do porta-enxerto sobre as trocas gasosas, área foliar e superfície de raiz de mudas de *Coffea arabica* L. *Revista Ceres*, 53, 86-91.
- Trethewey, R.N., Geigenberger, P., Riedel, K., Hajirezaei, M.R., Sonnewald, U., Stitt, M., Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., 1998. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant Journal*. 15, 109-118.

- Valliyodan, B., Nguyen, H.T., 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 9, 189–195.
- Vasudeva, N., Venkataramanan, D., Raju, K.I., Ratageri, M.C., 1981. Preliminary studies on the pattern of accumulation of proline in coffee cultivars during drought. *Turrialba*. 31, 388-390.
- Wilkinson, S., Corlett, J.E., Oger, L., Davies, W.J., 1998. Effects of xylem pH on transpiration from wild type and flacca tomato leaves. A vital role for abscisic acid in preventing excessive water loss even from well-watered plants. *Plant Physiology*. 118, 703–709.
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 1997. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiology*. 113, 559–573.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., VanCamp, W., 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO Journal*. 16, 4806-4816.
- Zhang, A. Jiang, M., Zhang, J., Tan, M., Hu, X., 2006. Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in Abscisic Acid-Induced Antioxidant Defense and Acts Downstream of Reactive Oxygen Species Production in Leaves of Maize Plants. *Plant Physiology*. 141, 475–487.
- Zhang, J., Davies, J.W., 1991. Antitranspirant activity in xylem sap of maize plants. *Journal of Experimental Botany*. 42, 317–321.