

BRUNA PEREIRA DE SOUZA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA ABSORÇÃO E
METABOLISMO DO NITROGÊNIO E DO DÉFICIT HÍDRICO EM CAFÉ
ARÁBICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

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

T

S729a
2015 Souza, Bruna Pereira de, 1989-
Aspectos fisiológicos e moleculares da absorção e
metabolismo do nitrogênio e do déficit hídrico em café arabica /
Bruna Pereira de Souza. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 65f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Herminia Emilia Prieto Martinez.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fisiologia vegetal. 2. Café. 3. Café - Absorção de água.
4. Nitrogênio - absorção. 5. Expressão gênica. 6. Metabolismo.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.
Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.73

BRUNA PEREIRA DE SOUZA

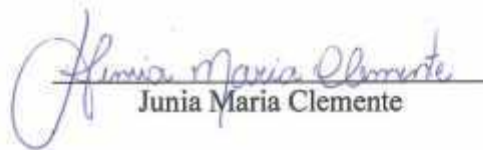
**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA ABSORÇÃO E
METABOLISMO DO NITROGÊNIO E DO DÉFICIT HÍDRICO EM CAFÉ
ARÁBICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2015.



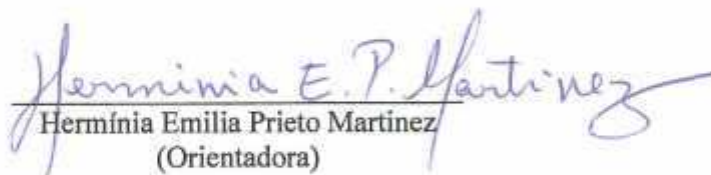
Ivo Ribeiro Da Silva



Junia Maria Clemente



Eveline Teixeira Caixeta
(Coorientadora)



Hermínia Emilia Prieto Martínez
(Orientadora)

À minha querida e amada mãe, meu exemplo de vida e orgulho,

a quem devo tudo o que sou e o que conquistei até hoje;

À minha irmã, pelo incentivo e apoio;

Ao Felipe, pelo amor e companherismo

Dedico e Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, fé, inspiração e proteção para contemplar essa conquista.

A minha mãe Raquel e a minha irmã Bárbara, pelo amor incondicional, pelos inúmeros incentivos de coragem e determinação, que me proporcionaram força para encarar com sabedoria as fases e dificuldades da vida.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio através da concessão da bolsa de estudos.

A professora Hermínia Emilia Prieto Martinez, pela orientação, confiança, apoio na execução deste trabalho e, principalmente, pelo exemplo de ética no exercício da profissão. Foram muitas as dificuldades como também foram muitas as superações.

A pesquisadora da Embrapa Café, Eveline Teixeira Caixeta, pela co-orientação, pelo auxílio imprescindível no desenvolvimento e elaboração deste trabalho, ensinamentos, confiança e utilização do seu laboratório.

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro pelas sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Ivo Ribeiro da Silva por disponibilizar estrutura física essencial na condução dos experimentos e disponibilidade para participação na banca de defesa.

A EPAMIG pela concessão das sementes das cultivares de café utilizadas na realização do presente trabalho.

A bolsista de pós doutorado Junia pela colaboração nos experimentos e sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao meu marido Felipe Paolinelli, pelo amor, carinho, companheirismo, paciência nas horas mais difíceis durante a realização deste trabalho e ajuda desde a montagem dos experimentos até as valiosas sugestões na elaboração deste trabalho.

Aos amigos Junia e Wallas e aos estagiários Rodolfo e Léo pela ajuda na condução e coleta dos experimentos. Juan e Alice pela ajuda e ensinamentos da biologia molecular.

Aos Amigos do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé), Dani, Samila, Rose, Juan, Dênia, Carla, Leticia e Carol por terem me acolhido de braços abertos.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Junia, Wallas, Iza, Laura, Murilo e Marialva pelos momentos de descontração e alegria.

Aos amigos de Viçosa e do Laboratório de Herbicida, que foram muito importantes nos momentos de dificuldades, cansaço e nos momentos de descontração e alegria.

A minha família, pelo companheirismo, pelo carinho e pelo amor proporcionados durante todos esses anos.

As amigas Khrisna Oliveira, Paula Dias e Ludmilla Biasi por serem as irmãs que Deus me permitiu escolher que, mesmo de longe, estiveram presentes no meu dia-a-dia.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o êxito deste trabalho, meu eterno agradecimento.

BIOGRAFIA

BRUNA PEREIRA DE SOUZA, filha de Raquel de Queiroz Pereira e Adriano de Oliveira Souza, nasceu em Teófilo Otoni, MG, em 29 de janeiro de 1989. Concluiu o ensino básico em dezembro de 2006, no Colégio Promove, em Uberlândia, MG. Em fevereiro de 2008, iniciou o curso de Agronomia, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em Diamantina, MG, graduando-se em bacharelado em fevereiro de 2013. Ingressou, em março de 2013, no Programa de Pós-graduação em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo a defesa de sua dissertação em fevereiro de 2015.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO..... | viii |
| ABSTRACT..... | x |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| Café: origem e importância econômica..... | 1 |
| Déficit Hídrico..... | 2 |
| Nitrogênio..... | 3 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 6 |

CÁPITULO I

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 10 |
| ABSTRACT..... | 12 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 18 |
| 2.1. Parâmetros Cinéticos da Absorção de Nitrato..... | 18 |
| 2.1.1 Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental..... | 18 |
| 2.1.2. Parâmetros da cinética de absorção: V_{max} , K_m e C_{min} | 20 |
| 2.1.3. Determinação dos teores de nitrogênio e nitrato no material vegetal..... | 21 |
| 2.1.4. Análises estatísticas..... | 21 |
| 2.2. Expressão Gênica..... | 22 |
| 2.2.1. Material vegetal, condições de cultivo..... | 22 |
| 2.2.2. Extração de RNA..... | 23 |
| 2.2.3. Síntese de cDNA..... | 23 |
| 2.2.4. Análise da expressão via PCR em Tempo Real..... | 24 |
| 2.2.5. Análises estatísticas..... | 26 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 26 |
| 3.1. Parâmetros cinéticos de absorção de nitrato..... | 25 |
| 3.2. Expressão Gênica..... | 34 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 43 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |

CÁPITULO II

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 51 |
| ABSTRACT..... | 52 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 53 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 54 |
| 2.1. Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental..... | 54 |
| 2.2. Potencial hídrico foliar..... | 56 |
| 2.3. Trocas gasosas..... | 56 |
| 2.4. Variáveis de fluorescência..... | 56 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 57 |
| 3.1. Potencial Hídrico Foliar..... | 57 |
| 3.2. Trocas Gasosas..... | 58 |

| | |
|---|----|
| 3.3. Variáveis da Fluorescência da Clorofila <i>a</i> | 61 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 63 |
| CONCLUSÕES GERAIS..... | 63 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 64 |

RESUMO

SOUZA, Bruna Pereira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Aspectos fisiológicos e moleculares da absorção e metabolismo do nitrogênio e do déficit hídrico em café arábica.** Orientadora: Hermínia Emília Prieto Martinez. Coorientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Marcelo Ehlers Loureiro.

O cafeeiro possui baixa eficiência de uso de nitrato como fonte inorgânica de N, sendo que as causas fisiológicas e genéticas dessa reduzida resposta ainda não são totalmente conhecidas. Além do uso eficiente de fertilizantes, outro fato que vem impactando a produção agrícola em geral e a cafeicultura é a seca. A escassez de água será um dos maiores problemas globais neste século. Portanto é fundamental entender os mecanismos moleculares e fisiológicos pelos quais plantas terrestres se adaptam a falta de água com o objetivo de desenvolver práticas agrícolas mais racionais de aproveitamento da água e nitrogênio. Assim sendo, este trabalho objetivou: a) a obtenção de parâmetros cinéticos de absorção de nitrato por mudas de café cultivadas em solução nutritiva na ausência e presença de déficit hídrico; b) avaliar o perfil transcricional de genes relacionados aos transportadores de nitrato (NRT3.2 e NRT1.2) e genes relacionados ao metabolismo do N (NIA2, GLN1.3 e GLT1) em condição de déficit hídrico e deficiência de N; c) avaliar as trocas gasosas e os parâmetros de fluorescência da clorofila a em condições de déficit hídrico e deficiência de nitrogênio. Para alcançar os objetivos propostos foram realizados quatro experimentos separadamente. No primeiro, oito cultivares de café foram submetidas a ensaio de exaustão para determinação dos parâmetros cinéticos de absorção de nitrato em solução nutritiva. No segundo e terceiro experimentos, as cultivares Catuaí Amarelo (alto V_{max}) e Mundo Novo (baixo V_{max}), selecionadas a partir dos resultados do primeiro experimento, foram submetidas aos seguintes tratamentos: N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem déficit hídrico, N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) com déficit hídrico (-1,5 MPa) e N-deficiente (-N, 0,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem déficit hídrico para avaliação de expressão diferencial de genes. No quarto experimento cinco cultivares de café foram submetidas aos seguintes tratamentos: N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem déficit hídrico, N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) com déficit hídrico (-1,5 MPa) e N-deficiente (-N, 0,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem déficit hídrico, para avaliar as características fisiológicas relacionadas com a fotossíntese e parâmetros da clorofila a. O déficit hídrico foi imposto pela aplicação de polietileno glicol 8000. Em todos experimentos utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com três

repetições. Os parâmetros cinéticos de absorção de nitrato variaram entre as cultivares em condições controle e sob déficit hídrico. As cultivares Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Catucaí Amarelo, Catiguá MG2, Acauã, Oeiras e Sachimor são as que possuem maior velocidade de absorção em condições de ausência de déficit hídrico. Em condições de déficit hídrico, a cultivar Catuaí Amarelo possui a maior velocidade de absorção. A cultivar Mundo Novo não apresentou alterações nos parâmetros cinéticos avaliados quando o déficit hídrico foi imposto. A cultivar Catuaí Amarelo apresentou melhor adaptação à condição de déficit hídrico. Essa cultivar possui também maior plasticidade, podendo se estabelecer mais facilmente em condições com altos ou baixos teores de NO₃⁻, como também em baixa disponibilidade hídrica. Os genes estudados (NRT1.2, NRT3.2, NIA2, GLT e GLN1.3) aumentaram a sua expressão em plantas submetidas ao déficit hídrico e a deficiência de N. A cultivar Mundo Novo apresentou maior expressão relativa dos genes NRT1.2, NRT3.2 e GLT em tecidos radículas 96 h após a imposição do déficit hídrico. Na parte aérea das mudas de café os genes NRT1.2 e NRT3.2 foram os que exibiram maior expressão relativa, as 8 h e 96 h após imposição do déficit hídrico, respectivamente. Quando o déficit hídrico foi imposto, os genes NRT1.2, NRT3.2, NIA2 e GLT apresentaram maior transcrição diferencial no sistema radicular das plantas. Já o gene GLN1.3, em condições de reduzida disponibilidade de água apresentou maior expressão na parte aérea das plantas. O déficit hídrico provocou maiores alterações na expressão relativa dos genes estudados do que o tratamento com deficiência de N. A deficiência de N causou menores danos ao aparelho fotossintético das plantas que o déficit hídrico. O déficit hídrico afetou o potencial hídrico foliar, a fotossíntese líquida, condutância estomática, eficiência do uso da água, taxa de transporte de elétrons, eficiência quântica do FSII e eficiência fotoquímica máxima do FSII das mudas de café, reduzindo-os durante o período. Já para o tratamento com deficiência de nitrogênio, apenas as variáveis taxa de transporte de elétrons, eficiência quântica do FSII e eficiência fotoquímica máxima do FSII das mudas de café foram afetadas e também apresentaram redução.

ABSTRACT

SOUZA, Bruna Pereira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Physiological and molecular aspects of absorption and nitrogen metabolism and drought in *Coffea Arabica*.** Adviser: Hermínia Emília Prieto Martinez. Co-advisers: Eveline Teixeira Caixeta and Marcelo Ehlers Loureiro.

The coffee has low nitrate use efficiency as a source of inorganic N, and the physiological and genetic causes of this reduced response are still not fully known. In addition to the requirement of large amounts of nitrogen fertilizers, another challenge to the food production in general, and for coffee production in particular, is drought. Water scarcity is one of the biggest global problems in this century. Therefore it is important to understand the molecular and physiological mechanisms by which plants adapt the lack of water in order to develop more rational farming practices use of water and nitrogen. Therefore, this study aimed to: a) obtaining kinetic parameters of nitrate uptake by coffee seedlings grown in nutrient solution in the absence and presence of water deficit; b) evaluate the transcriptional profile of genes related to nitrate transporters (NRT3.2 and NRT1.2) and genes related to metabolism of N (nia2, GLN1.3 and GLT1) in drought condition and deficiency of N; c) assess gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in conditions of drought and nitrogen deficiency. To achieve the proposed objectives were carried out four experiments separately. In the first eight coffee varieties were subjected to exhaustion assay for determining the kinetic parameters of the nitrate uptake in nutrient solution. In the second and third experiments, the Catuaí Amarelo cultivars (high V_{max}) and Mundo Novo (low V_{max}), selected from the results of the first experiment were submitted to the following treatments: N-sufficient (N +, 5.0 mmol L⁻¹ N-NO₃) without deficit, N-sufficient (N +, 5.0 mmol L⁻¹ N-NO₃) with water deficit (-1.5 MPa) and N deficient (N, 0.0 mmol L⁻¹ N-NO₃) without deficit to evaluate differential gene expression. In the fourth experiment, five coffee cultivars were submitted to the following treatments: N-sufficient (N +, 5.0 mmol L⁻¹ N-NO₃-) without water deficit, N-sufficient (N +, 5.0 mmol L⁻¹ N-NO₃-) with water stress (-1.5 MPa) and N-deficient (N, 0.0 mmol L⁻¹ N-NO₃-) without water deficit, to evaluate the physiological characteristics related to photosynthesis and parameters Chlorophyll a. The drought was imposed by applying polyethylene glycol 8000. In all experiments we used the randomized block design with three replications. The kinetic parameters of nitrate uptake varied among cultivars in control conditions and under water deficit. The cultivars Catuaí Vermelho, Catuaí

Amarelo, Catucaí Amarelo, Catiguá MG2, Acauã, Oeiras and Sarchimor are those with higher rate of absorption in conditions of absence of water deficit. In drought conditions, Catucaí Amarelo has the highest rate of absorption. The cultivar Mundo Novo had no change in kinetic parameters evaluated when the drought was imposed. The Catucaí Amarelo showed better adaptation to drought condition. This cultivar also has higher plasticity, and can be established more easily in conditions with high or low levels of NO₃⁻, but also in low water availability. The genes studied (NRT1.2, NRT3.2, nia2, GLT and GLN1.3) increased its expression in plants subjected to water stress and the deficiency of N. Mundo Novo presented higher relative expression of genes NRT1.2, NRT3.2 and GLT in root tissue 96 h after the imposition of water deficit. In shoots of coffee seedlings the NRT1.2 NRT3.2 genes were those that exhibited the highest relative expression, 8 h and 96 h after imposition of drought, respectively. When the drought was imposed, the NRT1.2 genes, NRT3.2, NIA2 and GLT had higher differential transcription in the root system of plants. Already GLN1.3 gene in reduced water availability conditions showed higher expression in the shoot. The drought has caused major changes in the relative expression of the genes studied than N deficiency. Nitrogen deficiency caused minor damage to the photosynthetic apparatus of plants that the water deficit. The drought affected the leaf water potential, net photosynthesis, stomatal conductance, water use efficiency, electron transport rate, quantum efficiency of PSII and photochemical efficiency of PSII of coffee seedlings, reducing them during the period. For the treatment with nitrogen deficiency, only the variables electron transport rate, quantum efficiency of PSII and photochemical efficiency of PSII of coffee seedlings were affected and also decreased.

INTRODUÇÃO GERAL

Café: origem e importância econômica

O gênero *Coffea* L. é composto por 103 espécies de acordo com Davis et al. (2006). Entre essas as espécies *Coffea arabica* (café arábica), *C. canephora* (café robusta) e *C. liberica* (café libéria) são espécies cultivadas com intuito comercial, sendo as demais apenas utilizadas em programas de melhoramento. Todo o comércio mundial de café utiliza-se das espécies de *C. arabica* e *C. canephora*, sendo que a primeira representa aproximadamente 62 % de produção mundial (Dias et al., 2007).

A movimentação de mais de 90 bilhões de dólares ao ano e geração de 500 milhões de empregos coloca o agronegócio do café em grande destaque no cenário econômico e social mundial (Rezende & Rosado, 2004).

No Brasil, a cultura chegou em meados de XVIII, com mudas vindas da Guiana Francesa, e adaptou-se rapidamente ao solo e clima, sendo, desde esse período, de grande importância na geração de emprego e na balança comercial do país. Atualmente, o Brasil possui a maior produção e exportação mundial de café (MAPA, 2013).

O Brasil possui 15 estados produtores de café, com destaque para Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia. Todo o agronegócio do café envolve cerca de 287 mil produtores, na maioria mini e pequenos produtores, distribuídos em aproximadamente 1.900 municípios e 2,311 milhões de hectares, cultivando 5,67 bilhões de pés de café e com exportações que chegam a 32,01 milhões de sacas. Estima-se, ainda, que 8 milhões de pessoas estão ligadas direta ou indiretamente a essa atividade (MAPA, 2013). O Brasil, também desponta como maior produtor, com cerca de 30% da produção mundial, e segundo maior consumidor de café (Davis et al., 2006).

Apesar de toda importância do café no Brasil, a produção tem sido afetada pelas condições climáticas, principalmente devido a ocorrência de períodos cada vez mais prolongados de seca. Além disso, estudos atuais apontam para cenário de climas mais extremos com secas prolongadas, inundações e ondas de calor mais frequentes, como consequência do fenômeno do aquecimento global (Salati et al., 2012). Além da seca, outro fator limitante para a cafeicultura é o uso eficiente de fertilizantes nitrogenados, sendo um grande desafio a obtenção de elevada produtividade com aplicações reduzidas de fertilizantes nitrogenados.

Déficit Hídrico

A falta de água no solo leva a diferentes respostas nas plantas, entre elas podem-se destacar as respostas bioquímicas e fisiológicas, que incluem fechamento estomático, repressão de crescimento celular, redução da taxa fotossintética, aumento da taxa respiratória, ajustamento osmótico, diminuição na eficiência do uso de água, modulação da partição de assimilados e defesas contra danos oxidativos, sendo que essas respostas acontecem em níveis celulares e moleculares (Shinozaki & Yamagusho-Shinozaki, 2007).

Nas regiões produtoras, o cafeeiro sofre com as condições ambientais, podendo considerar-se o déficit hídrico por ser um dos principais estresses que podem afetar o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade (DaMatta & Ramalho, 2006). Em condição de limitação hídrica a planta aciona mecanismos de sobrevivência. A primeira resposta é a redução da abertura estomática como forma de restrição à perda de água excessiva, concomitantemente ocorre redução na assimilação de carbono devido ao aumento da resistência a entrada do CO₂ nos estômatos (DaMatta & Ramalho, 2006; DaMatta, 2004). Além da regulação estomática e redução da assimilação de carbono, pode-se citar ajustamento osmótico, modulação da partição de assimilados, baixo crescimento celular, complexos de defesa contra estresse oxidativos e outros em nível celular e molecular, que consomem energia anteriormente destinada ao crescimento e desenvolvimento da planta.

Qualquer restrição hídrica ou por déficit de nitrogênio acarreta em baixa produtividade do cafeeiro, resultando em respostas da planta que levam primeiramente a decréscimo da taxa fotossintética. Dessa forma, em regiões susceptíveis a seca, cultivares com maior eficiência do uso de nitrogênio e água ou que possuem capacidade de manutenção do crescimento nessas condições restritivas são desejáveis.

Para o entendimento das respostas fisiológicas diferenciais apresentadas pelas plantas em condição de estresse hídrico ou nutricional, as variáveis fisiológicas frequentemente utilizadas são as trocas gasosas - taxa fotossintética líquida, condutância estomática e a razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a) e a avaliação da fluorescência da clorofila *a*. Estas variáveis estão ligadas com a capacidade fotossintética das plantas, em que reduções na taxa fotossintética ocorrem por redução na condutância estomática e na relação C_i/C_a e/ou por diminuição na taxa de assimilação do C por danos ao aparato fotossintético e aumento da relação C_i/C_a .

A análise da fluorescência da clorofila *a* pode ser feita de forma rápida e não destrutiva (Murchie & Lawson, 2013). Os parâmetros relacionados fluorescência da clorofila *a* informam sobre a capacidade fotoquímica do FSII, referente à capacidade de absorção e transferência de energia luminosa e danos fotooxidativos em decorrência de estresses (Maxwell e Johnson 2000). Danos fotooxidativos ocorrem devido à redução da etapa bioquímica não acompanhada da etapa fotoquímica, pois os fotossistemas continuam a absorver energia luminosa, não existindo demanda suficiente pelos compostos redutores gerados. Este descompasso entre as duas etapas pode acarretar em danos fotooxidativos e as plantas exibem uma gama de mecanismos para evitá-los ou minimizá-los.

Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um macronutriente essencial necessário para o crescimento e desenvolvimento das plantas e fator limitante chave na produtividade agrícola. Entre as formas de N disponíveis (nitrato, amônio, aminoácidos, peptídios, etc), o nitrato é a fonte mais abundante de N para plantas em áreas cultivadas com café. As plantas cultivadas possuem uma baixa eficiência de uso do nitrogênio (NUE), esta eficiência, atualmente, é de 30 – 50 %. Dessa forma, grande parte dos fertilizantes nitrogenados fornecidos, são perdidos por lixiviação e volatilização no solo causando assim efeitos deletérios ao ambiente. (Rockström et al., 2009; Foley et al., 2012).

As plantas absorvem fontes orgânicas e inorgânicas de N presentes no solo, porém o nitrato é a principal forma adquirida pelas raízes do cafeeiro, podendo ocorrer também a absorção de amônio (Reis, 2007; Miller et al., 2007). Em solos cultivados, a magnitude do N inorgânico pode variar na faixa de micromolar (μM) a millimolar (mM) (Miller et al., 2007; Marschner, 2012; Wang et al., 2012).

Para se adaptar a essas variações de N no solo, a aquisição e transporte de nitrato em plantas ocorre por meio de transportadores de membrana que atuam em faixas específicas quanto à afinidade por seu substrato. Os transportadores de baixa afinidade (Low Affinity Transporter System ou LATS) realizam o transporte de forma não saturável para concentrações de N acima de 1 mM. Enquanto que os transportadores de alta afinidade (High Affinity Transporter System ou HATS) são responsáveis pela aquisição de N em concentrações menores que 1 mM (Marschner, 2012; Wang et al., 2012). Em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* e em algumas plantas cultivadas, como *Solanum lycopersicum* e *Oryza sativa*, os principais transportadores que participam da absorção de N em alta afinidade (HATS) e em baixa (LATS) já são conhecidos (Krouk et al., 2010; Yan et al., 2011; Wang et al., 2012; Hsu & Tsay, 2013).

Um aspecto de grande relevância a ser levado em consideração para a implantação de regimes de adubação para uma cultura, assim como a sua alocação para ambientes com diferente disponibilidade de nutrientes é a eficiência que a cultura possui em aproveitar os nutrientes disponíveis na solução do solo. Levando em consideração a variabilidade genética existente entre espécies e cultivares, tais finalidades podem ser alcançadas pela avaliação de variáveis fisiológicas. Dentre as variáveis fisiológicas, os parâmetros cinéticos de absorção de nutrientes representados pela velocidade máxima de absorção – V_{max} , pela constante de Michaelis-Menten – K_m e pela concentração mínima – C_{min} , indica a maior ou menor capacidade de absorção de íons pelas plantas a uma dada concentração no meio. O V_{max} refere-se à quantidade do nutriente absorvida quando todos os sítios dos carregadores presentes nas membranas das células das raízes estiverem saturados. Já o valor de K_m exibe a concentração do íon/nutriente em solução na qual é atingida a metade da velocidade máxima de absorção, significando que, quanto menor for o seu valor, maior será a afinidade do íon com os sítios de absorção (Epstein; Hagen, 1952). O C_{min} indica a concentração mínima na qual as raízes podem extrair um nutriente a partir da solução (Marschner, 2012)

A conservação da alta produtividade da cultura cafeeira tem acarretado o aumento do consumo de fertilizantes à base de N. Em 2012, aproximadamente 2,8 milhões de toneladas de fertilizante nitrogenado foram utilizados no Brasil (ANDA, 2012). Entre as espécies cultivadas, o cafeeiro é uma das mais exigentes em nitrogênio. Dependendo das condições da lavoura e da expectativa de produção, a recomendação de nitrogênio pode chegar a 450 kg de N/ha (Pereira, 2006), sendo que o N é o nutriente exigido em maior quantidade pela cultura do café e o segundo mais exportado pela planta. Apesar de suas práticas de manejo estarem bem definidas, muitos aspectos da cultura ainda necessitam de esclarecimentos, pois as perdas de N no solo podem chegar a 50% (Reichardt et al., 2009).

O aproveitamento efetivo do N pelas plantas em formação é menor que 40 % do fertilizante inicialmente aplicado. Diante disso, a intensificação da agricultura nos últimos anos tem gerado a degradação de fontes de água e ecossistemas marinhos devido à lixiviação de nitrato (Foley et al., 2012; Vitousek et al., 2009). Como também a contaminação da atmosfera, devido à emissão de gases causadores do efeito estufa, como o óxido nitroso e a amônia (Galloway et al., 2008) devido ao constante aumento do N reativo em ecossistemas terrestres (Martinelli & Filoso, 2008; Austin et al., 2013).

Características como atividade de enzimas identificadas como chave no controle de rotas metabólicas, a expressão de genes alvo e variáveis relacionadas ao aparato

fotossintético das plantas, podem ser utilizadas como biomarcadores (Vasconcelos & Raghothama, 2006; Srivastava & Singh, 2006; Hirel et al., 2007). As vias de estudo descritas são fundamentais para elucidar os mecanismos que relacionam nutrição mineral de plantas ao controle genético, especialmente em condições de estresses, como o estresse hídrico ou nutricional, o que no futuro subsidiará a escolha precoce de cultivares com maior eficiência nutricional e que possuem melhor adaptabilidade a estas condições.

Levando em consideração esses aspectos, melhorar a eficiência do uso de fertilizantes a base de N em plantas cultivadas, reduzindo assim o uso de fertilizantes à base de nitrogênio é altamente desejável para uma agricultura produtiva e sustentável, e representa um grande desafio para a agricultura moderna (Simmons et al., 2008; Foley et al., 2012).

Assumindo o déficit hídrico e a adubação nitrogenada como os fatores que mais limitam a produção do cafeeiro, este trabalho foi dividido em duas partes, a primeira visou avaliar alterações nas variáveis da cinética de absorção de nitrato em mudas de cafeeiro submetidas a um período curto de déficit hídrico e analisar a expressão de genes relacionados à absorção e metabolismo de N em resposta ao déficit hídrico e a falta de N. Na segunda parte avaliou-se as respostas fisiológicas relacionadas à fotossíntese nessas mesmas condições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDA - Associação Nacional para Difusão de Adubos, 2012. Anuário Estatístico do Setor de Fertilizantes, São Paulo.
- Austin AT, Bustamante MMC, Nardoto GB, Mitre SK, Pérez T, Ometto JPHB, Ascarrunz NL, Forti MC, Longo K, Gavito ME, Enrich-Prast A, Martinelli LA. Latin America's nitrogen challenge. *Science* 340: 149. 2013
- DaMatta FM. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazil. J. Plant Physiol.* 16:1-6. 2004
- DaMatta FM & Ramalho JDC Drought and temperature stress on coffee physiology and production. *Braz. J. Plant. Physiol.* 18(1):55-81. 2006
- Davis AP, Govaerts R, Bridson DM, Stoffelen P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152: 465–512. 2006
- Dias PC, Araujo WL, Moraes GABK, Barros RS, DaMatta FM Morphological and physiological responses of two coffee progenies to soil water availability. *Journal of Plant Physiology*, 164(12): 1639-1647. 2007
- Esptein E, Hagen E. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology*, Illinois, v. 27, n. 3, p. 457-474. 1952
- Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O'Connell C, Ray DK, West PC, Balzer C, Bennett EM, Carpenter SR, Hill J, Monfreda C, Polasky S, Rockström J, Sheehan J, Siebert S, Tilman D et al.. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478: 337–342. 2012
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320:889-8892. 2008
- Hirel, B.; Gouis, J.; Ney, B. & Gallais, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J. Exp. Bot.*, 58:2369-2387, 2007
- Hsu PK & Tsay YF. Two Phloem Nitrate Transporters, NRT1.11 and NRT1.12, Are Important for Redistributing Xylem-Borne Nitrate to Enhance Plant Growth. *Plant Physiology*, October, Vol. 163, pp. 844–856. 2013
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Walker, FP, Malinska K, Mounier E, oyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, Zazimalova E, Benkova E, Nacry P, Gojon A. Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrientensing in Plants. *Developmental Cell* 18, 927–937, June 15, 2010

- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Culturas: Café, 2013. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2014
- Marschner, H. Mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. San Diego: Academic, 651 p. 2012
- Martinelli LA, Filoso SS. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. *Ecol Appl* 18: 885–898. 2008
- Maxwell K & Johnson GN. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J Exp Bot*, 51:659-668. 2000
- Murchie EH & Lawson, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.*, 64:3983-3998, 2013
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM. Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot* 58: 2297–2306. 2007
- Pereira da Costa FM. Crescimento e Desenvolvimento do cafeeiro em efeito da adubação nitrogenada. 2006. 80f. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006
- Rezende AM & Rosado, PL. A informação no mercado de café. In: Zambolim L, editor. Produção integrada de café, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp. 1-46. 2004
- Reichardt K, Silva AL, Fenilli, TAB, Timm LC, Bruno IP, Volpe CA. Relation between nitrogen fertilization and water soil conditions for a coffee plantation from Piracicaba, SP. *Coffee Science*, Lavras, v. 4, n. 1, p. 41-55, Jan-jun. 2009
- Rockström J, Steffen W, Noone K, Persson A, Chapin FS, Lambin EF, Lenton TM, Scheffer M, Folke C, Schellnhuber HJ, Nykvist B, de Wit CA, Hughes T, van der Leeuw S, Rodhe H, Sörlin S, Snyder PK, Costanza R, Svedin U, Falkenmark M. et al. A safe operating space for humanity. *Nature* 461: 472–475. . 2009
- Salati E, Santos AA dos, Nobre C. As mudanças climáticas globais e seus efeitos nos ecossistemas brasileiros. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/clima/clima14.html>>. Acesso em: 12 nov. 2014
- Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58: 221-227, 2007
- Simmons, B.A., Loqué, D., and Blanch, H.W. Next-generation biomass feedstocks for biofuel production. *Genome Biol* 9: 242. 2008
- Srivastava AK & Singh S. Biochemical markers and nutrient constraints diagnosis in citrus: a perspective. *J. Plant Nutr.*, 29:827-855, 2006
- Vasconcelos MJV & Raghobama KG. Análise da expressão de genes induzidos por fósforo em genótipos contrastantes de milho, selecionados para eficiência do uso de

fósforo. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 26; 2006. Anais. Belo Horizonte, ABMS. CD-ROM. 2006

Vitousek PM, Naylor R, Crews T, David MB, Drinkwater LE, Holland E, Johnes PJ, Katzenberger J, Martinelli LA, Matson PA, Nziguheba G, Ojima D, Palm CA, Robertson GP, Sanchez PA, Townsend AR, Zhang FS. *Science*, 234, 1510. 2009

Wang X, Bian Y, Cheng K, Zou H, Sun SSM, He JX. A Comprehensive Differential Proteomic Study of Nitrate Deprivation in Arabidopsis Reveals Complex Regulatory Networks of Plant Nitrogen Responses. *J. Proteome Res.*, 11, 2301–2315. 2012

Yan M, Fan X, Feng H, Miller AJ, Shen Q, Xu G Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant, Cell and Environment* 34, 1360–1372. 2011

CAPITULO I

**CINÉTICA DE ABSORÇÃO DE NITRATO E EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS AO METABOLISMO E TRANSPORTE DE NITROGÊNIO
INFLUENCIADAS PELO DÉFICIT HÍDRICO EM CAFÉ ARÁBICA**

RESUMO

SOUZA, Bruna Pereira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Cinética de absorção de nitrato e expressão de genes relacionados ao metabolismo e transporte de nitrogênio influenciadas pelo déficit hídrico em café arábica.** Orientadora: Hermínia Emília Prieto Martinez. Coorientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Marcelo Ehlers Loureiro.

Entre os numerosos fatores que afetam a produtividade do cafeeiro, a nutrição mineral nitrogenada e a disponibilidade hídrica para as plantas são fatores essenciais à produção agrícola. O objetivo desta pesquisa foi caracterizar cultivares de *Coffea arabica*, quanto à capacidade de absorção de nitrato na fase de muda, em condições de déficit hídrico e na ausência de déficit hídrico. O trabalho foi composto por três experimentos. No primeiro experimento avaliou-se a cinética de absorção de nitrato das cultivares Catuaí Vermelho IAC44, Catuaí Amarelo 62, MGS Paraíso MG2, Mundo Novo IAC379-19, Acauã, Oeiras 6851 e Sarchimor MG8840. Foram determinados, os parâmetros de absorção V_{max} , K_m , C_{min} , bem como os teores de nitrato na parte aérea e sistema radicular, transpiração e velocidade estimada de absorção de nitrato. O experimento foi conduzido em solução nutritiva e as plantas foram avaliadas em condições de ausência de estresse hídrico (controle) e em déficit hídrico moderado de -1.5 MPa, imposto pela aplicação do polietileno glicol 8000. No segundo experimento objetivou-se avaliar a influência do déficit hídrico na transcrição diferencial de genes relacionados à absorção e metabolismo do N. Duas cultivares de café com alta (Catuaí Amarelo) e baixa (Mundo Novo) velocidade de absorção de nitrato, selecionadas a partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, foram submetidas aos seguintes tratamentos: N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem déficit hídrico (tratamento controle) e N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) com déficit hídrico (-1,5 MPa). No terceiro experimento objetivou-se avaliar a influência do nitrogênio na transcrição diferencial de genes relacionados à absorção e metabolismo do N, duas cultivares de café com alta (Catuaí Amarelo) e baixa (Mundo Novo) velocidade de absorção de nitrato, selecionadas a partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, foram submetidas aos seguintes tratamentos: N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem déficit hídrico (tratamento controle) e N-deficiente (-N, 0,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem déficit hídrico. Avaliou-se o perfil transcricional de genes relacionados aos transportadores de nitrato (NRT3.2 e NRT1.2) e genes relacionados ao metabolismo do N (NIA2, GLN1.3 e GLT1). Nos três experimentos utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com três repetições.

As plantas submetidas a estresse hídrico reduziram a transpiração em média de 36 %, independentemente da cultivar. Os parâmetros cinéticos de absorção de nitrato variaram entre as cultivares em condições de ausência e presença de déficit hídrico, destacando-se as cultivares Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Catiguá MG2, Acauã, Oeiras e Sachimor que possuem maior velocidade de absorção em condições de ausência de déficit hídrico. Já em condições de déficit hídrico, a cultivar Catuaí Amarelo apresentou a maior velocidade de absorção. A cultivar Mundo Novo não apresentou alterações nos parâmetros cinéticos avaliados quando o déficit hídrico foi imposto. Os genes estudados (NRT1.2, NRT3.2, NIA2, GLT e GLN1.3) aumentaram a sua expressão em plantas submetidas ao déficit hídrico e a deficiência de N, tanto na parte aérea como no sistema radicular das mudas de café. A cultivar Mundo Novo apresentou maior expressão relativa dos genes NRT1.2, NRT3.2 e GLT em tecidos radiculares 96 h após a imposição do estresse hídrico. Na parte aérea das mudas de café, os genes NRT1.2 e NRT3.2 foram os que exibiram maior expressão relativa, as 8 h e 96 h após imposição do déficit hídrico, respectivamente. Os genes NRT1.2, NRT3.2, NIA2 e GLT, quando o déficit hídrico foi imposto, apresentaram maior transcrição diferencial no sistema radicular das plantas. Já o gene GLN1.3, em condições de déficit hídrico, apresentou maior expressão na parte aérea das plantas. A deficiência de N induziu maior expressão relativa dos genes NRT1.2, NIA2 e GLT, na cultivar Mundo Novo 96 h após a aplicação deste tratamento. A cultivar Catuaí Amarelo apresentou melhor adaptação à condição de déficit hídrico. Essa cultivar possui também grande plasticidade, podendo se estabelecer mais facilmente em condições com altos ou baixos teores de N, como também em baixa disponibilidade hídrica. O déficit hídrico provocou maior expressão relativa dos genes estudados do que o tratamento com deficiência de N.

ABSTRACT

SOUZA, Bruna Pereira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2015. **Nitrate uptake kinetics and expression of genes related to metabolism and nitrogen transport affected by drought in *Coffea Arabica***. Adviser: Hermínia Emília Prieto Martinez. Co-advisers: Eveline Teixeira Caixeta and Marcelo Ehlers Loureiro.

Among the many factors affecting the coffee yield, nitrogen mineral nutrition and water availability are essential to agricultural production. The objective of this research was to characterize seedlings of cultivars of *Coffea arábica*, as the nitrate uptake capacity in water stress conditions and in the absence of water deficit. The work consisted of three experiments. In the first experiment there was evaluated the nitrate uptake kinetics of the cultivars Catuaí Vermelho IAC44, Catuaí Amarelo 62, MGS Paraiso MG2, Mundo Novo IAC379-19, Acauã, Oeiras 6851 and Sarchimor MG8840. There were determined, the parameters of absorption V_{max} , K_m , C_{min} , and the nitrate levels in the shoot and root system, transpiration and estimated rate of nitrate uptake. The experiment was conducted in nutrient solution and the plants were evaluated under conditions of absence of water stress (control) and moderate water deficit of -1.5 MPa, imposed by the application of polyethylene glycol 8000. In the second experiment we aimed to evaluate the influence of water deficit in differential gene transcription related to absorption and metabolism of N. Two coffee cultivars with high (Catuaí Amarelo) and low (Mundo Novo) rate of nitrate uptake, selected from the results obtained in the first experiment were submitted to the following treatments: N- sufficient (N +, 5.0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) without water deficit (control) and N-sufficient (N +, 5.0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) with water stress (-1.5 MPa). In the third experiment we aimed to evaluate the influence of nitrogen in the differential transcription of genes related to absorption and metabolism of N, two coffee cultivars with high (Catuaí Amarelo) and low (Mundo Novo) nitrate absorption rate, selected from results of the first experiment were submitted to the following treatments: N-sufficient (N +, 5.0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) without water deficit (control) and N-deficient (N, 0.0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) without water deficit. We evaluated the transcriptional profile of genes related to nitrate transporters (NRT3.2 and NRT1.2) and genes related to metabolism of N (NIA2, GLN1.3 and GLT1). In the three experiments we used the randomized block design with three replications. Plants under water stress reduced perspiration on average 36%, regardless of the cultivar. The kinetic parameters of nitrate uptake varied among

cultivars in conditions of absence and presence of water deficit, highlighting the Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Catiguá MG2, Acauã, Oeiras and Sachimor cultivars which have higher rate of absorption in the absence of water deficit. Already in drought conditions, Catuaí Amarelo had the highest rate of absorption. The cultivar Mundo Novo had no change in kinetic parameters evaluated when the drought was imposed. The genes studied (NRT1.2, NRT3.2, nia2, GLT and GLN1.3) increased its expression in plants subjected to water stress and the N deficiency, both in the shoot and in the root system of coffee seedlings. The cultivar Mundo Novo presented higher relative expression of genes NRT1.2, NRT3.2 and GLT in root tissue 96 h after the imposition of water stress. In shoots of coffee seedlings, the NRT1.2 and NRT3.2 genes were those that exhibited the highest relative expression, 8 h and 96 h after imposition of drought, respectively. The NRT1.2 genes, NRT3.2, nia2 and GLT, when the drought was imposed, showed greater differential transcription in the root system of plants. Already GLN1.3 gene in water stress conditions, showed higher expression in the shoot. Nitrogen deficiency induced higher relative expression of genes NRT1.2, NIA2 and GLT in Mundo Novo 96 h after application of this treatment. The Catuaí Amarelo showed better adaptation to drought condition. This cultivar also has great plasticity, may be established more easily in conditions with high or low N content, but also in low water availability. The water deficit caused greater relative expression of the genes studied than the nitrogen deficiency.

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes essenciais de maior demanda metabólica e que mais limita a produtividade das culturas (Lea & Azevedo, 2006). Assim, o cultivo de plantas com o objetivo de se obter alta produção de grãos ou ainda produzir grãos ricos em proteínas requer grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados. O uso de fertilizantes nitrogenados pelas plantas é geralmente ineficiente, sendo que 50 a 70% do N aplicado é perdido no sistema solo-planta (Peoples et al., 1995). Como consequência, nas últimas décadas o incremento em duas vezes na produção mundial de alimentos agrícolas foi alcançado com o incremento em 20 vezes na quantidade de fertilizantes nitrogenados (Shrawat & Good, 2008).

O aumento no uso de fertilizantes nitrogenados resulta em vários danos ambientais, como a contaminação do lençol freático e rios por nitrato (Davies & Sylvesterbradley, 1995) e emissão de óxido nítrico (Bouwman et al., 2002). Dessa forma, a eficiência no uso de fertilizantes nitrogenados é crucial para sustentar a produção agrícola. A disponibilidade hídrica, por sua vez, reduz a assimilação de carbono e a absorção de nutrientes, prejudicando o crescimento e podendo levar as plantas a morte em condições mais severas de deficiência hídrica.

O nitrato é a fonte mais abundante de N para as plantas. As culturas possuem baixa eficiência de uso dessa fonte devido, entre outros, à lixiviação no solo, causando assim efeitos deletérios ao ambiente. Levando também em consideração os altos custos desse fertilizante, existe a necessidade de melhorar a eficiência e reduzir seu emprego a fim de manter a sustentabilidade agrícola (Simmons et al., 2008; Rockström et al., 2009; Foley et al., 2012).

Assim, a necessidade de reduzir os problemas causados por fertilizantes nitrogenados tem fortalecido a necessidade de melhorar a eficiência no uso de nitrogênio (EUN) nas culturas agrícolas. Isso torna necessário o desenvolvimento de cultivares que capturem e assimilem o N de maneira mais eficiente podendo reduzir a necessidade de fertilizantes nitrogenados ou aumentar a produção sem a necessidade de aumentar a aplicação de fertilizantes e sem afetar o meio ambiente (Shrawat & Good, 2008).

Além disso, o N é um dos nutrientes responsáveis pelos altos custos de produção agrícola e por isso tem recebido muita atenção nas pesquisas. A redução do uso de fertilizantes nitrogenados pode ser alcançada não só por meio de técnicas eficientes de cultivo, mas também pelo uso de variedades que tenham uma alta eficiência no uso de

nitrogênio. O desenvolvimento de tais variedades é favorecido por um melhor conhecimento das bases fisiológicas e genéticas da eficiência no uso de nitrogênio (Hirel et al., 2001). Uma abordagem importante é entender a resposta de plantas a diferentes regimes de N e diferentes regimes hídricos, especialmente a condições de disponibilidade limitante, e estudar a nível fisiológico e molecular as plantas que apresentam melhor desenvolvimento nessas condições (Kant et al., 2011).

A absorção de nitrato pelas células é mediada por proteínas transportadoras específicas localizadas na membrana plasmática. Esses transportadores pertencem a família gênica NRT (*Nitrate Transporter*), que, dependendo das concentrações do íon no meio operam em alta ou baixa afinidade pelo substrato (Fernandes & Souza, 2006). Os transportadores de alta afinidade (HATS - “High Affinity Transport System”) operam em baixas concentrações de NO_3^- e podem ser divididos em dois grupos. Os denominados constitutivos (cHATS), são aqueles que operam a concentrações de aproximadamente $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$; os induzidos (iHATS), os que operam a concentrações menores que $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. Os transportadores de baixa afinidade (LATS - “Low Affinity Transport System”) atuam em concentrações acima de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Siddiqi et al., 1990; Aslam et al., 1992; Aslam et al., 1993). Os HATS e os LATS são codificados, respectivamente, pelas famílias gênicas NRT2 e NRT1.

Na família NRT1, foi identificado um transportador, o CHL1 (close homolog of L1 – também conhecido como NRT1.1), que apesar de ser classificado nessa família, atua como transportador de dupla afinidade, estando envolvido tanto no sistema de transporte de nitrato de baixa afinidade, como no de alta afinidade (Liu et al., 1999; Camargo et al., 2007; Wang et al., 2012).

Além dos transportadores, outras proteínas envolvidas na absorção do nitrato pela célula têm sido identificadas. A proteína NAR2 (Nitrate Assimilation Related) foi encontrada em *Chlamydomonas reinhardtii*, e apesar de não ter seu mecanismo de atuação bem estabelecido, sabe-se que é uma proteína reguladora e essencial para o sistema de absorção de nitrato de alta afinidade. Em arábido (*Arabidopsis thaliana*) foram encontrados dois genes, AtNRT3.1 e AtNRT3.2, semelhantes ao *C. reinhardtii* cuja expressão foi induzida em até 6 vezes na presença nitrato. Desta forma, sugeriu-se que é necessária à presença da proteína NAR para a ativação dos transportadores de nitrato em Arabidopsis. A comprovação da necessidade dessa proteína na absorção foi realizada por meio da injeção de proteínas NRT2 e NAR2 em oocistos. A absorção de nitrato ocorreu quando as proteínas foram injetadas juntas, quando a injeção foi realizada contendo somente uma das proteínas, o transporte para o interior da célula não

foi observado. Estudo realizado por Okamoto et al (2003) em plantas também confirmaram a necessidade da proteína NAR para que ocorra o transporte de nitrato.

A absorção de nitrato, assim como a de outros nutrientes, pode ser avaliada por meio dos parâmetros cinéticos de absorção, definidos como V_{max} (velocidade máxima de absorção de nitrato por unidade de raiz, ou seja, com todos os transportadores saturados), K_m (constante de Michaelis-Menten, que representa a concentração externa de nitrato necessária para que a absorção seja metade de sua V_{max}) e C_{min} (concentração externa na qual o fluxo líquido de íons é zero - Rocha et al., 2014). A técnica usual para a obtenção desses parâmetros é a proposta por Claassen e Barber (1974) usando solução nutritiva e condições controladas de câmara de crescimento. O V_{max} é a absorção potencial da planta, o K_m reflete inversamente a afinidade do transportador com o nutriente em estudo.

O N, quando absorvido na forma nítrica, deverá ser reduzido a amônio (NH_4^+), para poder ser incorporado a compostos orgânicos e exercer suas funções metabólicas ou poder ser estocado no vacúolo (Marschner, 2012).

Nitrato redutase (NR) é a enzima que catalisa o primeiro passo de assimilação do nitrato. É bem conhecido que a expressão de genes NR é rapidamente induzido por nitrato em diversas plantas. A NIA2 é um dos dois genes que codificam para a redutase do nitrato em plantas, e este gene é predominantemente expresso em folhas verdes. Além disso, o gene NIA2 é responsável por 90 % de toda a atividade de NR da planta enquanto NIA1 responde pela atividade residual (10 %), este é um gene constitutivo (Price et al., 2004; Gojon et al., 2009).

A proteína glutamina sintetase (GS) esta envolvida no processo de assimilação do nitrogênio, ela é responsável pela assimilação primária de amônio em plantas superiores. Ela catalisa a reação glutamato, oriundo do ciclo de Calvin, e NH_4^+ em glutamina (Epstein & Bloom, 2006). As plantas têm dois tipos de isoenzimas GS classificadas de acordo a sua localização na célula. A GS1, que é a principal forma encontrada nas raízes das plantas, esta localizada no citosol e a GS2 encontrada nos plastos/cloroplastos. Em Arabidopsis, as isoenzimas codificadas por GLN1.3 (GS1), não é estimulada por amônio, no entanto, sua atividade é significativamente inibida por elevada concentração de glutamato. Além disso, a expressão da GS1 é metabolicamente regulada pela disponibilidade de fontes de N e carbono (Morey et al., 2002).

A glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GLT1) é uma enzima dependente de NADH (NADH-GOGAT). O NADH-GOGAT GLT1 mRNA é expresso em níveis mais elevados em raízes do que em folhas. Este padrão de expressão contrasta com

GLU1, o principal gene que codifica Fd-GOGAT, que é mais altamente expresso nas folhas e está envolvido em fotorespiração. Estes padrões de expressão específicos de órgãos distintos sugere um papel fisiológico não redundante para a NADH-GOGAT e produtos do gene Fd-GOGAT.

As enzimas GS/GOGAT desempenham um papel fundamental no metabolismo das plantas, pois além de representarem a principal via de entrada de Nitrogênio orgânico novo, proveniente do ambiente (assimilação primária), também participam da reciclagem do NH_4^+ gerado em diversos processos metabólicos tais como a fotorrespiração, o "turn over" de proteínas, o catabolismo de aminoácidos carreadores de N, reações de biossíntese envolvendo aminoácidos e a biossíntese de lignina - conversão de fenilalanina em cianamato catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase.

O déficit hídrico, por sua vez, pode afetar direta e indiretamente a absorção de N. A absorção pelas plantas é regulada pela disponibilidade na superfície radicular, que depende do conteúdo e movimento de água no solo. O conteúdo de água no solo afeta o crescimento e extensão do sistema radicular e aquisição via intercepção radicular depende desse crescimento. Adicionalmente NH_4^+ e NO_3^- podem mover-se do solo para a superfície das raízes por fluxo de massa e difusão, ambos relacionados à água do solo. A difusão parece ser mais importante na absorção de NH_4^+ , enquanto que o movimento do NO_3^- depende principalmente do fluxo de massa (McDonald & Davies, 1996).

Pesquisas recentes indicaram que o déficit hídrico altera a nutrição nitrogenada mesmo quando o N mineral está totalmente disponível no solo, resultando em baixa concentração de N na parte aérea que pode culminar em deficiência (Gonzalez-Dugo et al., 2012). Esses autores estudaram o efeito do estresse hídrico em gramíneas utilizando ^{15}N e PEG 6000, e observaram que além do seu efeito sobre a mobilidade do nutriente no solo e sobre o crescimento das raízes, a absorção de água e estado hídrico têm efeito direto na absorção e alocação de N. Concluíram que o aumento da tensão hídrica no solo leva ao acúmulo significativo de N nas raízes, o que pode limitar sua alocação em folhas.

Para otimizar a eficiência de aquisição e uso de nitrogênio é essencial que ele seja fornecido em concentrações ótimas e coincidindo com a máxima capacidade das raízes de absorvê-lo, o que em tese permitiria alcançar a produção máxima por unidade de N aplicado (Lawlor et al., 2001). Para melhorar as práticas de fertilização, o

conhecimento dos parâmetros cinéticos de absorção e do efeito do déficit hídrico sobre a absorção de nitrogênio de espécies e cultivares são pré-requisitos.

O N é de longe o nutriente mais exigido pelo cafeeiro, demandando doses anuais que variam entre 200 e 450 kg/ha/ano (Guimarães et al.,1999), de modo que o estudo da cinética de absorção e expressão de genes relacionados à absorção e metabolismo do N por cultivares distintas podem fornecer subsídios para os cafeicultores alocarem as cultivares de interesse para distintos sítios da cafeicultura brasileira, bem como adotarem diferenciados regimes de adubação para diferentes condições. Estas medidas podem refletir no uso racional de corretivos e fertilizantes, reduzindo os custos de produção, além de contribuir para a manutenção da sustentabilidade da cafeicultura.

Dessa forma, objetivou-se neste trabalho avaliar a cinética de absorção de nitrato em mudas de oito cultivares de *C. arabica* em condições de suficiência e déficit hídrico, bem como avaliar a transcrição diferencial de genes relacionados à absorção (genes transportadores de NO_3^-), e metabolismo do N (genes que codificam para enzimas do ciclo de assimilação no N), durante o período de déficit hídrico e deficiência de N em cultivares de café com velocidades de absorção de NO_3^- contrastantes.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Parâmetros Cinéticos da Absorção de Nitrato

2.1.1. Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 metros de altitude), Minas Gerais.

Foram utilizadas mudas de cafeeiro (*C. arabica*) das cultivares: Catuaí Vermelho IAC44, Catuaí Amarelo 62, MGS Paraíso MG2, Mundo Novo IAC379-19, Acauã, Oeiras 6851 e Sarchimor MG8840, obtidas a partir de sementes previamente germinadas em condições controladas. Inicialmente removeu-se o pergaminho das sementes e em seguida elas foram tratadas com hipoclorito de sódio 5 % por 15 minutos para controle de possíveis patógenos. Logo após foram lavadas três vezes com água destilada. Em seguida, 25 sementes foram colocadas para germinar em papel germiteste umedecido com água destilada e mantidas a temperatura de 30 °C, em germinador, por 40 dias.

As plantas foram aclimatadas em casa de vegetação por quatro semanas em caixas de 32 L contendo 30 L de solução nutritiva. Os nutrientes aplicados em solução

nutritiva eram provenientes de sais puros para análise e apresentavam as seguintes concentrações: 5,0 mmol L⁻¹ NO₃⁻, 0,5 mmol L⁻¹ P, 3,25 mmol L⁻¹ K, 1,0 mmol L⁻¹ Mg, 2,25 mmol L⁻¹ Ca, 2,125 mmol L⁻¹ S, 23 μmol L⁻¹ B, 0,3 μmol L⁻¹ Cu, 80 μmol L⁻¹ Fe, 12 μmol L⁻¹ Mn, 0,3 μmol L⁻¹ Mo e 1,0 μmol L⁻¹ Zn. A solução inicial foi de ½ força, com aeração constante e pH mantido em torno de 5,7 ± 0,3.

Após a aclimatação as plantas foram mantidas em caixas contendo 30 L de solução nutritiva e 15 plantas por caixa. A composição da solução nutritiva foi a descrita acima. Foi mantida aeração constante nas caixas e a solução renovada a cada vinte dias. As plantas foram mantidas nessas condições por um período de 240 dias, para o crescimento.

Quando as plantas apresentavam aproximadamente 28 cm de altura, onze pares de folhas, já emitindo ramos plagiotrópicos foram transferidas para uma câmara de crescimento com temperatura controlada (23-24 °C), luminosidade de 200 μmol m⁻² s⁻¹ e unidade relativa entre 56-58 % e submetidas ao fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro). As plantas foram transferidas para vasos contendo 1,0 L de solução nutritiva. Cada vaso contendo duas plantas constituiu uma unidade experimental.

Nos primeiros 15 dias, as plantas foram cultivadas em solução nutritiva, sem aplicação dos tratamentos para se adaptarem ao ambiente e com as seguintes concentrações de nutrientes: 5,0 mmol L⁻¹ NO₃⁻, 0,5 mmol L⁻¹ P, 3,25 mmol L⁻¹ K, 1,0 mmol L⁻¹ Mg, 2,25 mmol L⁻¹ Ca, 2,125 S, 23 μmol L⁻¹ B, 0,3 μmol L⁻¹ Cu, 80 μmol L⁻¹ Fe, 12 μmol L⁻¹ de Mn, 0,3 μmol L⁻¹ Mo e 1,0 μmol L⁻¹ Zn.

Aos 15 dias, após a adaptação das plantas ao ambiente, aplicaram-se os tratamentos em sistema hidropônico, para caracterização do processo de absorção de nitrato pela raiz. Primeiramente a solução nutritiva foi trocada por outra com a seguinte composição: 0,1 mmol L⁻¹ NO₃⁻, 0,05 mmol L⁻¹ P, 0,325 mmol L⁻¹ K, 0,1 mmol L⁻¹ Mg, 0,225 mmol L⁻¹ Ca, 0,2125 S, 0,23 μmol L⁻¹ B, 0,03 μmol L⁻¹ Cu, 0,8 μmol L⁻¹ Fe, 0,12 μmol L⁻¹ de Mn, 0,03 μmol L⁻¹ Mo e 0,1 μmol L⁻¹ Zn. Nesse momento também iniciou-se a imposição do déficit hídrico.

A deficiência hídrica foi imposta utilizando-se o polietileno glicol 8000 (PEG 8000), na dose de 355 g L⁻¹ (Villela & Beckert, 2001), aplicada de forma gradativa durante quatro dias, obtendo-se ao final da aplicação um potencial hídrico em torno de -1,5 MPa. Ao término da aplicação do PEG, ou seja, 96 horas depois, as plantas foram colocadas em vasos 1,5 L contendo 1,0 L de solução nutritiva contendo apenas 1,2 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻, fornecido como KNO₃ e com potencial hídrico de -1,5 MPa, obtido empregando-se a mesma dose de PEG 8000. Duas horas após a aplicação da dose

de nitrato, quando o estado estável de absorção foi atingido, o conjunto vaso-planta foi pesado e iniciou-se o ensaio de exaustão, com a retirada de amostras de 1,0 mL de solução nutritiva durante 48 horas. A solução retirada era repostada com água destilada. Ao final do período de 48 horas, o conjunto vaso/planta foi novamente pesado, de modo determinar a água perdida por transpiração. Após separou-se a parte aérea das plantas do sistema radicular, havendo também a separação de raízes finas e raízes grossas. Foi pesada a matéria fresca de raízes finas e grossas e também foi determinada a área foliar das plantas.

O experimento foi montado em um esquema em fatorial 8 x 2, sendo o primeiro fator oito cultivares de café (Catuaí Vermelho IAC44, Catuaí Amarelo 62, MGS Paraíso MG2, Mundo Novo IAC379-19, Acauã, Oeiras 6851, IAC 125RN e Sarchimor MG8840), e o segundo fator dois regimes hídricos (sem estresse hídrico e com estresse hídrico de -1,5 MPa) e três repetições onde cada parcela foi constituída por duas planta. Todas as coletas de solução nutritiva foram feitas respeitando o delineamento em blocos casualizados.

2.1.2. Parâmetros da cinética de absorção: V_{max} , K_m e C_{min}

A determinação dos parâmetros cinéticos V_{max} , K_m e C_{min} foi baseada no método proposto por Claassen e Barber (1974), o qual consiste em quantificar a redução na concentração de nutrientes da solução em função da absorção pelas plantas. Para isso, retiraram-se alíquotas de 1,0 mL da solução de depleção, sendo a primeira coletada no “tempo zero”, antes de colocar as mudas, e as demais em intervalos de uma hora, por um período de 24 h. Após, 24 h as coletas passaram a ser em intervalos de 2 h por um período de mais 12 h. Após, 36 h as coletas foram feitas em intervalos de 4 h por um período de mais 12 h. A última coleta foi efetuada com 48 horas após o início do período de exaustão.

Em seguida, separou-se a parte aérea e raiz das plantas, as raízes foram separadas em raízes finas e raízes grossas, determinando-se a massa fresca de raiz com o auxílio de uma balança digital (precisão de 0,001 g). Os teores de NO_3^- presentes nas alíquotas coletadas foram determinados por colorimetria segundo Doane & Horwath, 2003. Os teores de nitrato nas soluções de depleção, em cada tempo de amostragem, bem como os dados relativos ao volume inicial e final de solução nos vasos, e o peso de matéria fresca de raízes finas foram utilizados no software Cinética 2.0 (Ruiz & Fernandes Filho, 1992), obtendo-se, desse modo, os valores das constantes cinéticas V_{max} e K_m . O valor de C_{min} foi estimado para o tempo de 48 h de exaustão a partir da

equação obtida (quantidade x tempo) com o programa Cinética 2.0. As velocidades de absorção em diferentes concentrações externas foram calculadas utilizando-se a fórmula proposta por Michaelis Menten.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Em que:

V_0 : Velocidade inicial

V_{max} : Velocidade máxima da reação

K_m : Constante de Michaelis

S: Concentração de substrato

2.1.3. Determinação dos teores de nitrogênio e nitrato no material vegetal

O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar a 65 °C por 96 h, até que atingir peso constante. Em seguida pesou-se a matéria seca e amostras de folhas e raízes finas foram utilizadas na determinação da concentração de N total (Bataglia et al., 1983) e nitrato (Miranda et al., 2001; Doane & Horwath, 2003). O método descrito por Cataldo et al. (1975) foi utilizado para extração de nitrato em folhas e raízes e a dosagem foi feita utilizando o método proposto por Miranda et al. (2001); Doane & Horwath (2003). A leitura foi feita em espectrofotômetro em $\lambda = 410$ nm. A concentração de nitrato foi determinada utilizando-se curva padrão de solução nitrato.

2.1.4. Análises estatísticas

Efetuuou-se a análise de variância de todos os dados coletados, utilizando-se o teste F ($p \leq 0,05$) para verificar a ocorrência de efeitos significativos dos tratamentos. Logo após, realizou-se o desdobramento da interação, quando significativa. Os níveis do primeiro fator (cultivares) foram agrupados pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5% e os níveis do segundo fator (déficit hídrico) foram comparados pelo teste F ($p \leq 0,05$) que neste caso é conclusivo.

Os valores das velocidade de absorção estimada de NO_3^- em função da concentração externa do íon para cada nutriente estudado foram calculados com base na quantidade (μmol) de nutriente absorvida pelas plantas em relação à unidade de matéria fresca de raiz, mediante a utilização de aproximação gráfico-matemática (Ruiz, 1985). A separação das cultivares de café em grupos foi realizada utilizando valores das

velocidade de absorção estimada de NO_3^- na maior concentração do nutriente em solução por meio do agrupamento das médias dos cultivares pelo teste Scott-Knott à 5%.

2.2. Expressão Gênica

2.2.1. Material vegetal, condições de cultivo:

O material vegetal foi produzido em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 metros de altitude), Minas Gerais.

Utilizaram-se duas cultivares de café contratantes para a V_{\max} , Catuaí Amarelo (Alto V_{\max}) e Mundo Novo (Baixo V_{\max}) selecionadas no experimento 1. As plantas foram obtidas e aclimatadas à câmara de crescimento como descrito no item 2.1.

Aos 15 dias, após a adaptação das plantas ao ambiente, iniciou-se a imposição da deficiência hídrica em sistema hidropônico. Um terço dos vasos recebeu polietileno glicol (PEG 8000) para imposição do déficit hídrico. A dose de 355 g L^{-1} (Villela & Beckert, 2001) foi aplicada de forma gradativa durante quatro dias, obtendo-se ao final da aplicação um potencial hídrico de -1,5 MPa. Após este período a solução nutritiva de todos os vasos foi trocada. Os vasos que haviam recebido PEG 8000, receberam solução nutritiva com a mesma dose do produto de modo a manter o mesmo potencial hídrico na solução nutritiva. Neste momento também foi aplicado o tratamento de insuficiência de N a um terço dos vasos. O terço restante constituiu o tratamento controle, sem déficit hídrico ou de nitrogênio.

O material vegetal produzido e condicionado conforme o descrito anteriormente foi empregado em dois experimentos: o primeiro foi montado em esquema em fatorial 2 x 2, compostos de 2 cultivares de café (Catuaí Amarelo 62 e Mundo Novo IAC379-19) e dois tratamentos N-suficiente com déficit hídrico (+N, 5,0 mmol L^{-1} N- NO_3^- e potencial hídrico da solução nutritiva de -1,5 MPa) e o tratamento controle N-suficiente sem déficit hídrico (+N, 5,0 mmol L^{-1} N- NO_3^-); o segundo experimento também foi montado em esquema em fatorial 2 x 2, compostos de 2 cultivares de café (Catuaí Amarelo 62 e Mundo Novo IAC379-19) e dois tratamentos N-deficiente sem déficit hídrico (-N, 0,0 mmol L^{-1} N- NO_3^-) e o tratamento controle N-suficiente sem déficit hídrico (+N, 5,0 mmol L^{-1} N- NO_3^-). Os dois experimentos foram conduzidos no delineamento em blocos casualizados com três repetições onde cada parcela era constituída por duas plantas.

Ao final dos experimentos, foram realizadas coletas de amostras de folha em triplicata as: 8, 24 e 96 h após adição dos tratamentos e de raiz em triplicata aos: 8 e 96 h após aplicação dos tratamentos. Esse material foi coletado e imediatamente acondicionado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para posterior análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real. Todas as coletas de material vegetal foram feitas respeitando o delineamento em blocos casualizados.

2.2.2. Extração de RNA

Folhas e raízes das plantas de café das cultivares Catuaí Amarelo 62 e Mundo Novo IAC379-19, previamente congeladas à -80 °C, foram maceradas separadamente em N₂ líquido e destinadas à extração de RNA utilizando-se Concert® (Invitrogen) como extrator, segundo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas três repetições de cada cultivar. Cerca de 100 mg de material vegetal foi alíquotado em tubos de microcentrífuga de 2,0 mL de capacidade. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de tampão de extração Concert®. A amostra foi homogeneizada com o tampão por 2 min utilizando um vortex e mantida a temperatura ambiente por 10 min. Depois da incubação, o material foi centrifugado a 15.000 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo contendo 1 mL de fenol saturado/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1, v/v, pH 4,5). Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O passo anterior foi repetido até que o sobrenadante se tornasse totalmente limpo. Então, este foi coletado em novo tubo e centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante coletado e transferido para um tubo de microcentrífuga foi homogeneizado com 100 μ L de NaCl 5 mol L⁻¹ e, finalmente, adicionou-se um volume de 1 mL de isopropanol a -20 °C. A mistura foi incubada a -20 °C por pelo menos 10 min, seguindo-se centrifugação a 15.000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi imediatamente descartado e o pellet enxaguado com etanol 75 %, e seco à temperatura ambiente. O pellet foi ressuscitado em 30 μ L de água tratada com DEPC e armazenado a -80 °C até o momento do uso (Wang et al., 2007 adaptado).

O RNA total foi quantificado com o auxílio do Qubit RNA BR (Life Technologies) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com 1 μ L de brometo de etídio (Wilson e Walker, 2000).

2.2.3. Síntese de cDNA

Cada amostra de RNA foi analisada em triplicata e com o objetivo de eliminar o DNA contaminante, foi realizado o tratamento com DNase I (1 μ g para qRT-PCR), numa reação contendo os seguintes reagentes: 0,5 U de DNase I (RQ1 RNase-Free DNase; Promega); tampão de reação 10X, completando com água estéril tratada com DEPC para o volume final de 10 μ L. Depois, procedeu-se à incubação a 37 °C por 45 minutos. A inativação da DNase ocorreu mediante a adição de solução de parada (RQ1 DNase Stop Solution: Promega) e incubação a 65 °C por 10 minutos.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit Improm II (Promega), tomando-se como base as instruções do fabricante. Para cada reação foram utilizados 10 μ L do produto do tratamento com DNase I; 500 ng de oligo-dT(18) e 1 μ L de dNTPs (10 mmol 39 L⁻¹ cada), incubando a 65 °C por 10 min e, depois em gelo por 1 min. Foram adicionados 9 μ L da mistura composta por: 2 μ L de tampão de reação 10X, 2 μ L de MgCl₂ 50 mmol L⁻¹, 2 μ L de ditioneitol 100 mmol L⁻¹, 1 μ L de RNase OUT inhibitor (Promegan) e 1 μ L de água. Após uma breve centrifugação, a solução foi incubada a 42 °C por 2 min, e 1,5 μ L da enzima transcriptase reversa II foi adicionado, seguido de incubação a 42 °C por 1 h. A inativação da enzima ocorreu a 72 °C por 15 min. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo. Uma amostra controle (sem a enzima de transcrição reversa) foi adicionada e no final foi avaliada a eficiência da reação por PCR com primer constitutivo de Riboproteína 35S de *C. arabica*.

2.2.4. Análise da expressão via PCR em Tempo Real

As sequências do genoma de *Arabidopsis*, tomate e uva, relacionadas aos genes envolvidos com a absorção e assimilação do nitrato, foram obtidas do NCBI (www.ncbi.gov) e utilizadas para minerar sequências no Projeto Brasileiro do Genoma Café. Os genes usados na mineração foram NRT1.2 (*nitrate transporter 1:2* – transportador de nitrato transmembranar, foi utilizada sequência de *Arabidopsis thaliana* para mineração), NRT3.2 (*High-affinity nitrate transporter 3.2-like* – transportador de nitrato transmembranar, foi utilizada sequência de *Solanum lycopersicum* para mineração), NIA 2 (*nitrate reductase [NADH] 2* - codifica para a enzima nitrato redutase chave na assimilação de nitrato em plantas, foi utilizada sequência de *Arabidopsis thaliana* para mineração), GLN 1.3 (*glutamine synthetase cytosolic isozyme 1.3* - codifica para a enzima glutamina sintetase que está envolvida na assimilação do nitrato em plantas, foi utilizada sequência de *Solanum lycopersicum* para mineração) e GLT 1 (*glutamate synthase 1 [NADH]* - codifica para a enzima Sintetase do glutamato envolvida na via de assimilação de nitrato em plantas. Foi utilizada sequência de *Vitis*

vinifera para mineração). *Primers* que amplificam as sequências mineradas foram desenhados usando o programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e *Primer 3*. As condições usadas para o desenho dos *primers* foi tamanho aproximado de 19 a 21 bases, Tm (*melting temperature*) entre 56 e 60 °C, produzindo amplicons entre 90 e 130 pares de base. Os *primers* utilizados estão descritos no Tabela 1.

A validação dos *primers* foi realizada pela curva padrão relativa utilizando amostra do cDNA sintetizado diluída em volume original do cDNA, utilizando os seguintes fatores de diluição: 3, 9, 81, 243 e 729, com três repetições para cada diluição. A especificidade das reações de amplificação foi determinada pela Tm dos produtos da reação de amplificação. Foram considerados válidos os *primers* de equação linear com $R^2 > 98\%$, coeficiente de variação $< 10\%$, eficiência de amplificação entre 96 e 110 % e Sloop de aproximadamente -3, conforme sugerido pelo fabricante (Applied Biosystems, Foster City, US).

A análise de expressão relativa foi realizada em equipamento Step-One Plus (Applied Biosystems, US), utilizando triplicatas. A análise de dados foi feita utilizando o *software* Step-One Plus versão 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, US). Os valores do Ct (threshold cycle) das réplicas foram calculados pelo método de quantificação relativa dos níveis de cópia de amplificação (Ali-Benali et al., 2005).

De acordo com o protocolo de reação do Real Time, cada reação foi composta de 0,2 μmol^{-1} de cada *primer* (senso e antisenso), 0,1 μL de dNTPs 5 mmol L^{-1} , 2 μL de tampão PCR 10X, 1,2 μL de MgCl_2 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2 μL de SYBR green (100X), 0,4 μL de ROX, 0,05 μL de Platinum Taq DNA pol 5U/ μL (Invitrogen), 0,4 μL de cDNA e completando o volume para 10 μL com água. O programa de PCR foi de 90 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, 58 °C por 1 min. A curva de dissociação foi determinada pelas temperaturas de 60 °C elevando em 0,2 °C a cada 20 s até atingir 95 °C. Foram avaliados os materiais vegetais das coletas referentes a 8, 24 e 96 horas após aplicação dos tratamentos, e na análise dos dados, considerou-se as plantas bem supridas com N e ausência de déficit hídrico como controle comparativo da expressão relativa do gene.

Para normalizar a expressão relativa dos genes selecionados foi utilizado *primer* para o gene constitutivo GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) para folhas e S24 para raízes (proteína ribossomal) por apresentar menor desvio padrão entre os tratamentos (Cruz et al., 2010).

Tabela 1. *Primers* utilizados para o PCR em Tempo Real.

| Gene | Sequência do Primer | |
|--|-----------------------|----------------------|
| | Senso 5'-3' | Anti-senso 5'-3' |
| Primers Contitativos | | |
| GAPDH | AGGCTGTTGGGAAAGTTCTTC | ACTGTTGGAACTCGGAATGC |
| S24 | GCCCAAATATCGGCTTATCA | TCTTCTTGGCCCTGTTCTTC |
| Primers Relacionados a Transpotadores de NO₃⁻ | | |
| NRT 1.2 | AACAAGCTGCAACCATGAACA | AGCAAAGGGGATGATGCAAT |
| NRT 3.2 | GTTGGCTTTGGAGGCTTTGT | TGCCTTTGTGGGACAGGAAT |
| Primers Relacionados ao Metabolismo do N | | |
| NIA 2 | TCCCACGTTGATGCAGAACT | ATCGGCAAATCTCGTCCTG |
| GLN 1.3 | GGCTGGCAAAGGTTATTTTCG | CCTCATGGCTTCCACACAAT |
| GLT 1 | GAAACTCAGGTGCCAAAGCA | ACTCATGCCAGCAGCAAAGT |

2.2.5. Análises estatísticas

Os resultados de potencial hídrico foliar foram submetidos à análise de variância à significância de 5% de probabilidade e agrupadas pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à significância de 5% de probabilidade. As variáveis fisiológicas foram submetidas à análise de variância à significância de 5% de probabilidade e, quando significativo, os tratamentos com estresse foram comparados ao controle por contrastes de interesse utilizando o teste Scheffé à significância de 5% de probabilidade. As cultivares foram agrupadas pelo critério de Scott-Knott à significância de 5% de probabilidade.

Na determinação das diferenças estatística do padrão de expressão dos genes entre as cultivares foi utilizado análise de variância com teste *F* à 5 % de probabilidade, sendo comparadas pelo teste *Tukey* a 5 % de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Parâmetros cinéticos de absorção de nitrato

O déficit hídrico influenciou significativamente nas características teor de nitrato em folhas e raízes de mudas de café (Tabela 2). As concentrações foliares de nitrogênio total evidenciaram nutrição adequada das plantas, variando entre 19,1 a 22,6 g kg⁻¹ de N.

As cultivares Paraíso, Mundo Novo, Acauã e Oeiras exibiram as maiores concentrações de nitrato foliar, as cultivares Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho e

Catiguá formam o grupo das cultivares que exibiram menores teores de nitrato foliar no tratamento sem déficit hídrico (Tabela 2). Entretanto, o déficit hídrico imposto de -1,5 MPa causou um impacto negativo nas concentrações de nitrato foliar das cultivares Paraíso, Mundo Novo e Acauã. Já na cultivar Oeiras houve um aumento no teor de nitrato foliar, com valor 2,3 vezes superior em condição de déficit hídrico (Tabela 2).

Quanto ao teor de nitrato radicular, em condições de suficiência hídrica, tem-se dois grupos distintos formados pelas cultivares, um formado pelas cultivares Paraíso, Catiguá MG2 e Sachimor com alta concentração de NO_3^- e o segundo grupo composto pelas cultivares Catuaí Vermelho, Catuaí amarelo, Mundo Novo, Acauã e Oeiras com menor teor deste nutriente no sistema radicular (Tabela 2). Já em condições de déficit hídrico todas as cultivares apresentaram um incremento no teor radicular de NO_3^- , exceto na cultivar Mundo Novo, onde a concentração desse nutriente permaneceu inalterada (Tabela 2). Nessas condições, tem-se o grupo das cultivares Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho, Paraíso, Catiguá MG2, Acauã, Oeiras e Sachimor com maior teor de NO_3^- radicular e a cultivar Mundo Novo com menor teor deste nutriente.

Tabela 2. Concentração de nitrato (mg kg^{-1}) em folhas e raízes de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) sem e com estresse hídrico (-1,5 MPa)

| Cultivares | Estresse hídrico | | | |
|-----------------|-----------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| | Sem | | Com | |
| | Teor NO_3^- Foliar | | Teor NO_3^- Radicular | |
| | mg kg^{-1} | | mg kg^{-1} | |
| Catuaí Vermelho | 13,69 b | 16,26 b | 22,90 b* | 27,37 a* |
| Catuaí Amarelo | 12,23 b | 12,58 b | 22,48 b* | 27,48 a* |
| Paraíso | 27,44 a* | 10,54 c* | 23,82 a* | 28,58 a* |
| Catiguá MG2 | 12,11 b | 8,32 c | 26,01 a* | 30,89 a* |
| Mundo Novo | 23,07 a* | 8,66 c* | 18,65 b | 21,14 b |
| Acauã | 23,44 a * | 14,21 b* | 21,17 b* | 26,17 a* |
| Oeiras | 21,67 a* | 49,95 a* | 22,58 b* | 26,90 a* |
| Sachimor | 12,81 b | 11,00 c | 25,37 a | 26,26 a |
| Média | 15,85 | 17,12 | 23,15* | 23,15 * |
| CV (%) | 17,84 | | 9,54 | |

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5% e médias seguidas por * diferem na linha pelo teste F ($p \leq 0,05$).

As plantas submetidas ao déficit reduziram a transpiração em média de 36 %, independentemente da cultivar (Tabela 3). Os valores de transpiração foliar obtidos nas

cultivares testadas não permitiram diferenciá-las, pois não houve diferença entre as mesmas ($p \geq 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 3. Transpiração foliar (ml cm^{-2}) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) sem e com estresse hídrico (-1,5 MPa)

| Cultivares | Estresse hídrico | |
|-----------------|------------------|--------|
| | Sem | Com |
| Catuai Vermelho | 0,26 | 0,17 |
| Catuai Amarelo | 0,17 | 0,13 |
| Paraíso | 0,24 | 0,13 |
| Catiguá MG2 | 0,27 | 0,18 |
| Mundo Novo | 0,19 | 0,13 |
| Acauã | 0,24 | 0,13 |
| Oeiras | 0,22 | 0,15 |
| Sachimor | 0,24 | 0,15 |
| Média | 0,22 * | 0,14 * |
| CV (%) | 22,44 | |

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5% e médias seguidas por * diferem na linha pelo teste F ($p \leq 0,05$).

A absorção de nutrientes pelas plantas pode ser descrita por parâmetros cinéticos: V_{max} (máxima velocidade de absorção do nutriente por unidade de raiz), K_m (concentração externa na qual a velocidade de absorção é a metade da máxima) e C_{min} (concentração externa na qual o fluxo líquido de íons é zero).

A velocidade máxima de absorção de nitrato (V_{max}) foi influenciada pelo déficit hídrico e cultivares (Tabela 4). Os parâmetros cinéticos variam, principalmente, em função do genótipo, uma vez que constituem características da própria planta e que conferem à mesma maior ou menor capacidade de absorção do nutriente a uma dada concentração no meio externo. Um genótipo ou uma espécie são considerados eficientes na absorção de um determinado nutriente, quando os mesmos apresentarem parâmetros cinéticos que os qualificam como tal (Ali et al., 2010; Brix et al., 2010; Schoninger et al., 2013).

Tabela 4. Valores de V_{max} , K_m e C_{min} de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) sem e com estresse hídrico (-1,5 MPa)

| Cultivares | Estresse hídrico | | | | | | | |
|------------|--------------------------------------|--|------------------------|--|------------------------|--|-----|--|
| | Sem | | Com | | Sem | | Com | |
| | V_{max} | | K_m | | C_{min} | | | |
| | $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ | | $\mu\text{mol L}^{-1}$ | | $\mu\text{mol L}^{-1}$ | | | |

| | | | | | | |
|-----------------|---------|---------|-----------|----------|----------|---------|
| Catuaí Vermelho | 4,14 a* | 0,84 c* | 309,56 a* | 79,19 * | 52,48 b* | 21,97 * |
| Catuaí Amarelo | 4,49 a* | 2,92 a* | 209,82 b* | 104,06* | 16,33 c | 17,54 |
| Paraíso | 2,71 b* | 1,79 b* | 246,23 b* | 141,45 * | 45,54 b | 49,30 |
| Catiguá MG2 | 3,35 a* | 1,03 c* | 239,09 b* | 115,24 * | 52,52 b | 35,03 |
| Mundo Novo | 1,48 c | 1,03 c | 67,47 c | 76,19 | 13,74 c | 25,10 |
| Acauã | 3,90 a* | 2,15 b* | 244,68 b* | 113,32 * | 36,19 c | 29,37 |
| Oeiras | 3,95 a* | 2,11 b* | 332,59 a* | 131,55 * | 90,80 a* | 38,83 * |
| Sachimor | 3,75 a* | 0,97 c* | 240,79 b* | 73,17 * | 21,13 c | 24,28 |
| Média | 3,47 * | 1,60 * | 236,28 * | 104,27 * | 41,09 * | 30,18 * |
| CV (%) | 19,28 | | 26,14 | | 37,58 | |

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5% e médias seguidas por * diferem na linha pelo teste F ($p \leq 0,05$).

O déficit hídrico causou redução de aproximadamente 54 % da V_{\max} média das cultivares. Somente para a cultivar Mundo Novo a V_{\max} não se alterou (Tabela 4). Pode-se observar um grupo formado pelas cultivares Catuaí vermelho, Catuaí Amarelo, Catiguá MG2, Acauã, Oeiras e Sarchimor que possuem uma alta velocidade de absorção, um formado pela cultivar Paraíso que possui uma velocidade de absorção intermediária e um outro pela cultivar Mundo Novo que possui uma baixa velocidade de absorção na ausência do déficit hídrico.

O valor da V_{\max} é um indicativo da absorção máxima de um íon quando houver saturação de todos os sítios dos carregadores nas raízes, ou quando o giro do carregador atinge um máximo. Desse modo, pode-se sugerir que as cultivares que formam o grupo com alta velocidade de absorção possuem maior concentração de sítios de absorção de $N-NO_3^-$ que os demais materiais genéticos, ou que o giro destes carregadores na membrana plasmática apresentam maior velocidade, indicando que, provavelmente, essas cultivares apresentam maior potencial para responder a maiores investimentos em fertilizantes nitrogenados.

Uma planta eficiente no processo de absorção de um dado nutriente deveria ter alto V_{\max} e baixos valores para K_m e C_{\min} (Marschner, 2012). Pode-se observar esse comportamento, entre as cultivares avaliadas neste estudo em condições ausência de déficit hídrico, nas cultivares Catuaí Amarelo, Acauã e Sachimor (Tabela 3). A cultivar Mundo Novo, apesar de apresentar baixos valores de V_{\max} , apresenta valores muito baixos de K_m e C_{\min} , que podem compensar esse baixo V_{\max} (Tabela 4).

A cultivar Mundo Novo com menor V_{\max} pode apresentar uma menor capacidade no aproveitamento do N em condições de alta ou baixa disponibilidade do nutriente no solo, como também esse comportamento indica a provável ocorrência de

uma saturação dos carregadores em nível radicular, tornando o *turnover* dos carregadores desta cultivar mais lento. A cultivar Paraíso apresentou um valor de V_{max} intermediário, e esse comportamento pode ser considerado mais interessante do ponto de vista nutricional, pois, de acordo com Furtini et al. 1996, plantas que apresentam valores intermediários de V_{max} parecem refletir um mecanismo mais apurado na absorção do nutriente, uma vez que pode ocorrer a regulação do seu aproveitamento evitando excesso de absorção que poderia ocasionar uma eventual toxidez.

Quando o déficit hídrico foi imposto verifica-se Catuaí Amarelo com uma alta velocidade de absorção, ou seja, manteve uma alta velocidade de absorção mesmo quando foi submetida a uma condição seca, isso pode indicar que essa é uma cultivar promissora, pois mesmo quando submetida a essas condições ela continua com um alto V_{max} . De acordo com Salinas & Sanchez (1976) altos valores de V_{max} são esperados para genótipos desenvolvidos em condições de elevada fertilidade, como também indica provável ocorrência de um maior número de carregadores em nível radicular, ou, que o *turnover* dos carregadores dessa cultivar seja mais rápido se comparado com as demais cultivares (Furtini Neto, 1996).

As cultivares Paraíso, Acauã e Oeiras formam o grupo das cultivares com V_{max} intermediário e as cultivares Catuaí Vermelho, Catiguá MG2, Mundo Novo e Sarchimor com baixo V_{max} , quando são submetidas à condição de baixa disponibilidade hídrica (Tabela 3). A cultivar Mundo Novo apresentou um comportamento diferenciado em relação às demais cultivares. Mesmo quando o déficit hídrico foi imposto ela manteve o seu V_{max} . Na condição de estresse observa-se que a cultivar Catuaí Amarelo apresentou V_{max} superior às outras cultivares (Tabela 4).

O déficit hídrico (-1,5 MPa) causou redução na constante de Michaelis-Menten (K_m) de 55,9 % na média das cultivares, sendo que todas cultivares avaliadas tiveram redução nessa variável, exceto a cultivar Mundo Novo que não apresentou modificações nos valores de K_m (Tabela 4).

O valor de K_m representa a concentração de nutriente/íon em solução na qual é alcançada a metade da velocidade máxima de absorção, de forma que, quanto menor o seu valor, maior será a afinidade do íon com os sítios de absorção (Marschner, 2012). Desta forma, a cultivar Mundo Novo mostrou o menor valor de K_m em condições de ausência de déficit hídrico, ou seja, as proteínas transportadoras de NO_3^- na membrana plasmática das células radiculares dessa cultivar apresentam maior afinidade por esse nutriente. Segundo Anghinoni et al. (1989), menores índices de K_m e C_{min} são esperados para genótipos mais adaptados a condições de baixa fertilidade de solo.

As cultivares Catuaí Amarelo, Paraíso, Catiguá MG2, Acauã e Sarchimor que apresentaram K_m intermediário, e o grupo formado pelas cultivares Catuaí Vermelho e Oeiras apresentaram um alto K_m na ausência de déficit hídrico (Tabela 4). A cultivar Mundo Novo mostrou-se com valores inferiores de K_m em condição de ausência de déficit hídrico, porém em condições de estresse a cultivar apresentou valores semelhantes (Tabela 4). Desta forma, ela apresentou um mesmo comportamento para as variáveis V_{max} , K_m e C_{min} em ambas condições de disponibilidade hídrica. Valores baixos de K_m indicam que maior é a afinidade entre os sítios de absorção e o íon $N-NO_3^-$, porém, o baixo valor desta variável apresentado pela cultivar Mundo Novo não se traduziu em altas velocidades de absorção (Tabela 4).

A eficiência de absorção de um nutriente em baixa concentração na solução do solo será tanto maior quanto maior for o V_{max} e menor o K_m . Sendo assim, as cultivares Catuaí Amarelo, Catiguá MG2 e Sarchimor apresentam eficiente absorção de nitrato em condições de ausência de déficit hídrico (Tabela 4). Por outro lado, a cultivar Mundo Novo com menor K_m seria mais eficiente na absorção de nitrato numa condição de menor disponibilidade do íon sob condições de ausência de déficit hídrico.

No tratamento ausência de déficit hídrico observa-se a cultivar Oeiras com um alto C_{min} , um grupo formado pelas cultivares Catuaí vermelho, Paraíso e Catiguá MG2 com um C_{min} intermediário e outro grupo formado pelas cultivares Catuaí Amarelo, Mundo Novo e Acauã com baixo C_{min} (Tabela 4). A concentração mínima é um parâmetro cinético que mostra o potencial da planta para extrair o nutriente da solução do solo (Marschner, 2012), sendo que menores valores são atribuídos a plantas capazes de extrair de concentrações mais baixas de nutrientes na solução do solo e do ponto de vista prático, um maior potencial para cultivo em condições de baixa disponibilidade do nutriente no solo. Neste contexto, observa-se, que as cultivares Sarchimor, Catuaí Amarelo, Mundo Novo e Acauã conseguiram extrair o máximo de $N-NO_3^-$ da solução nutritiva no período de 48 horas, em função dos seus baixos valores de C_{min} . Já com a imposição do déficit hídrico, os valores de C_{min} obtidos com as cultivares testadas não permitiram diferenciá-las, pois não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) (Tabela 4).

Na comparação entre os tratamentos houve diferença apenas nas cultivares Catuaí Vermelho e Oeiras havendo uma redução do C_{min} (Tabela 4), indicando-nos que essas cultivares em condições de déficit hídrico conseguem aumentar o seu potencial de extração de nitrato do solo. Em áreas com baixa disponibilidade de nitrogênio, a cultivar Oeiras não seria interessante, pois apresentou um alto C_{min} , já cultivares como Catuaí Amarelo e Sarchimor, cultivares com menores valores de C_{min} seriam atraentes, pois são

capazes de operar o mecanismo de absorção de nitrato até concentrações relativamente baixas desse nutriente em solução.

Desta forma, quanto aos parâmetros de cinética de absorção para o nitrato em condições de déficit hídrico de -1,5 MPa, considerado um estresse moderado para a cultura do cafeeiro, percebe-se que as cultivares Catuaí Vermelho e Oeiras apresentaram redução nas três variáveis analisadas, ou seja, houve redução na V_{\max} compensada por redução também no K_m e C_{\min} . As cultivares Catuaí Amarelo, Catiguá MG2, Paraíso, Acauã e Sarchimor apresentaram redução no V_{\max} e K_m , e não apresentam diferença no C_{\min} entre os tratamentos. E a cultivar Mundo Novo não apresentou diferença em nenhum dos parâmetros analisados entre os tratamentos.

Uma cultivar eficiente nutricionalmente na absorção de nitrato é aquela que apresenta uma alta taxa inicial de absorção de nitrato, decorrente de alta afinidade do carregador com o nitrato (baixo K_m) e alcança uma concentração mínima baixa, absorvendo o máximo possível do nitrato da solução do solo (Nielsen & Barber, 1978). Nesse contexto, a cultivar Catuaí Amarelo seria a cultivar de café com maior flexibilidade para se adaptar a solos com altos ou baixos teores de nitrato (Tabela 4). Além dessas vantagens, o baixo valor de C_{\min} apresentado por esta cultivar destaca a sua capacidade para operar o mecanismo de absorção de nitrato até concentrações relativamente baixas desse nutriente em solução em relação as demais cultivares de café, esse comportamento pode ser percebido nas duas condições experimentais deste estudo.

Os valores de K_m e C_{\min} exibidos pelas cultivares, quando o déficit hídrico foi imposto, não mostrou diferença entre as mesmas (Tabela 4), isso pode indicar que essas cultivares apresentam semelhantes eficiências de absorção de NO_3^- em condições de baixa a média concentração desse nutriente na solução em condições ausência de déficit hídrico.

Quando o suprimento dos nutrientes não é limitante, o parâmetro V_{\max} é o que mais influencia a quantidade absorvida desses nutrientes pelas plantas. Contudo, quando o suprimento pelo solo é limitante, como ocorre em solos com baixas concentrações de nutrientes ou em períodos de déficit hídrico, o C_{\min} desempenha grande influência na absorção (Horn et al., 2006). Assim, pode-se concluir que as cultivares Catuaí Amarelo, Mundo Novo, Acauã e Sarchimor possuem uma alta capacidade de extração de nitrato em solos pobres nesse nutriente (Tabela 4).

Ressalta-se, na Figura 1, que o efeito conjunto de V_{\max} e K_m , representado pela velocidade de absorção estimada de NO_3^- em função da concentração externa do íon,

mostra que a cultivar Catuaí Amarelo apresentou maiores valores de absorção líquida, quando comparados com os obtidos pelas demais cultivares, em condições de ausência de déficit hídrico. Observa-se também um grupo formado pelas cultivares Catuaí Vermelho, Catiguá MG2, Acauã, Oeiras, Paraíso e Sarchimor com velocidade intermediária e a cultivar Mundo Novo com baixa velocidade líquida na faixa de concentrações externas empregadas (Figura 1).

A maior velocidade de absorção estimada apresentada pela cultivar Catuaí Amarelo é implicação do seu alto V_{max} e baixos valores de K_m e C_{min} (Tabela 4), como mencionado anteriormente, confirmando sua maior eficiência em manter a absorção de NO_3^- em condições de alta ou baixa disponibilidade de nitrato em solução. Esta observação é muito importante, uma vez que evidencia a grande plasticidade da cultivar Catuaí Amarelo para se ajustar às diversas condições edáficas em termos de maior ou menor disponibilidade de NO_3^- e água no solo.

A cultivar Mundo Novo devido, principalmente, ao menor valor de V_{max} apresentado, constituiu o grupo que apresentou menor velocidade de absorção estimada de NO_3^- (Figura 1), sugerindo que essa cultivar pode apresentar menor capacidade de absorver o NO_3^- em condições tanto de alta como de baixa disponibilidade do nutriente quando comparada a cultivar Catuaí Amarelo.

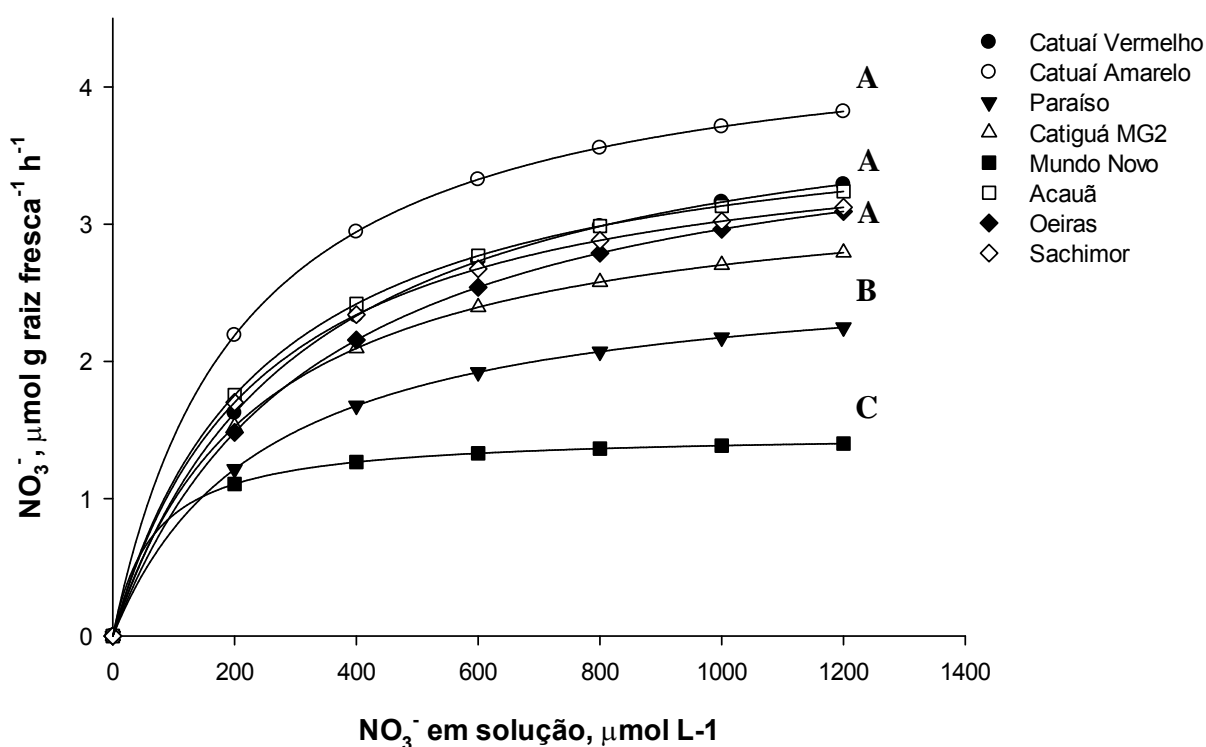


Figura 1: Absorção de NO_3^- por raízes de cultivares de café ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$), cultivadas em condição de suficiência hídrica, com a variação da concentração externa do íon ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Observa-se na Figura 2, a formação de três grupos de velocidade de absorção de NO_3^- em condições de déficit hídrico. Um grupo formado pela cultivar Catuaí Amarelo com alta velocidade de absorção de NO_3^- , outro formado pelas cultivares Paraíso, Acauã e Oeiras com velocidade de absorção intermediária de NO_3^- e outro grupo formado pelas cultivares Catuaí Vermelho, Mundo Novo e Sarchimor com baixa velocidade de absorção de NO_3^- em condições de déficit hídrico moderado.

A cultivar Catuaí Amarelo exibiu maior velocidade de absorção de NO_3^- estimada quando o déficit hídrico foi imposto, ou seja, ela manteve essas características mesmo com a imposição do déficit hídrico, em virtude do seu alto valor de V_{max} e do baixo valor de C_{min} (Tabela 4). Apesar dessa cultivar não ter apresentado um baixo valor de K_m em condições de déficit hídrico, comparativamente as demais cultivares (Tabela 4), foi observada maior velocidade de absorção estimada radicular do NO_3^- , sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos na eficiência de absorção de NO_3^- por esta cultivar em condições de ausência de déficit hídrico.

Devido à grande limitação ao crescimento, desenvolvimento e produtividade da cultura do cafeeiro causada pela deficiência de N e deficiência hídrica, seleção de cultivares de café com comportamento similar ao da cultivar Catuaí Amarelo é importante para maior eficiência na recuperação do nutriente aplicado e redução de custos com a adubação nitrogenada, como também para enfrentar períodos de seca sem comprometer a produção de biomassa.

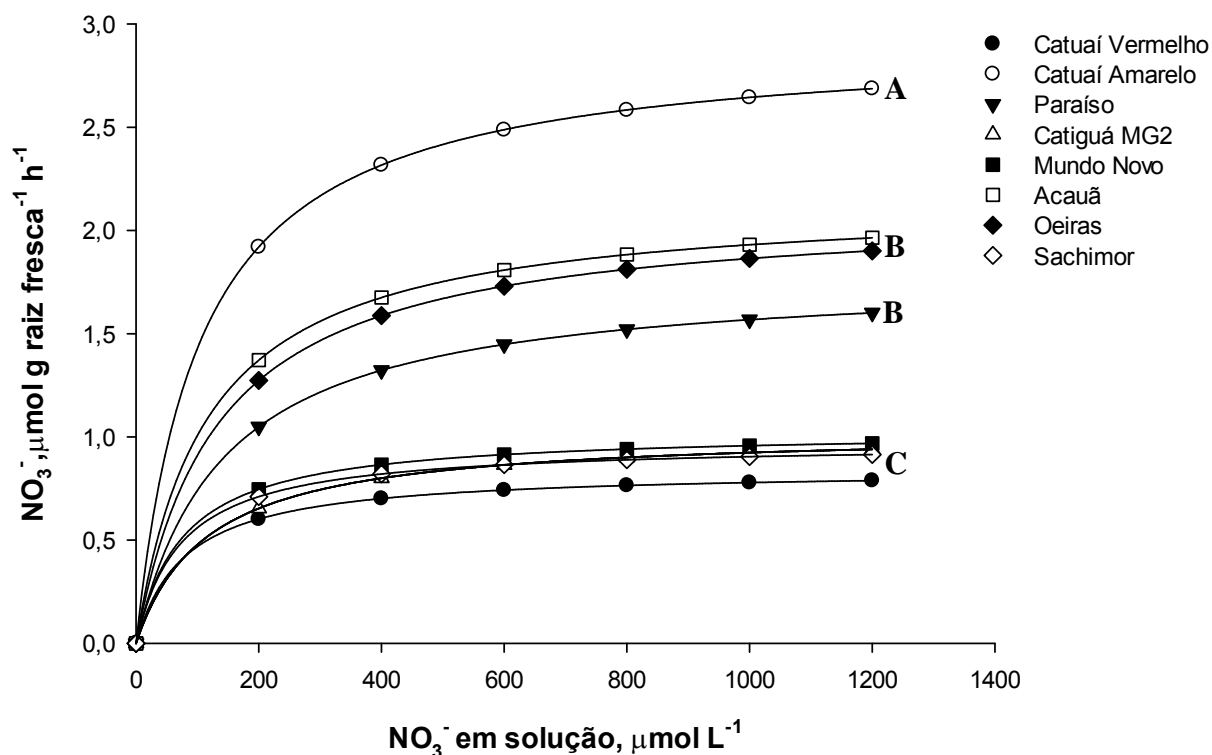


Figura 2: Absorção de NO_3^- por raízes de cultivares de café ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$), cultivadas em condição de déficit hídrico moderado (-1,5 MPa), como a variação da concentração externa do íon ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Cafeeiros jovens cultivados sem restrição hídrica apresentam V_{max} de absorção de nitrato em condições de ausência de déficit hídrico variando entre 1,48 e 4,49 $\mu\text{mol h}^{-1}$ por g de matéria fresca de raiz, enquanto que em déficit hídrico as V_{max} de absorção de nitrato variam entre 0,97 e 2,92 $\mu\text{mol h}^{-1}$ por g de matéria fresca de raiz.

Cafeeiros jovens cultivados na ausência de déficit hídrico apresentam K_m de absorção de nitrato variando entre 67,5 a 332,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que os submetidos a déficit hídrico apresentam K_m variando entre 73,2 e 141,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.2. Expressão Gênica

A expressão do gene NRT 1.2 em folhas e raízes variou até o valor de aproximadamente 4 entre os tratamentos, exceto a expressão do gene na raiz das cultivares após 96 horas em condição de déficit hídrico e em deficiência de nitrogênio (Figura 3 e 4).

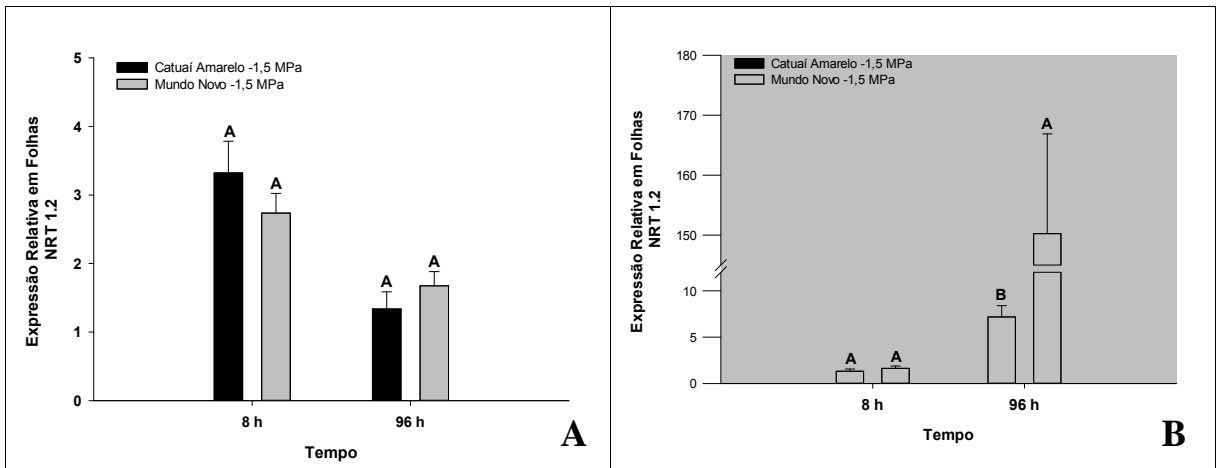


Figura 3: Expressão relativa do gene transportador de N (NRT1.2) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo, submetidas ao déficit hídrico de -1,5 MPa (potencial hídrico na solução da nutritiva ($|\Psi_w|$ -1,5 MPa), em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Na folha observou-se que não houve diferença da expressão do gene NRT 1.2 entre as cultivares, independentemente do tempo após a imposição do estresse hídrico (Figura 3A). Na raiz constatou-se maior expressão desse gene na cultivar Mundo Novo comparado a cultivar Catuaí Amarelo após 96 horas em déficit hídrico (Figura 3B).

Sob condição de déficit de nitrogênio houve diferença significativa entre as cultivares na expressão do gene NR 1.2 nas folhas analisadas 8 horas após colocadas nesta condição (Figura 4A). A expressão do mesmo gene na raiz foi superior para a cultivar Catuaí Amarelo as 8 horas e inferior as 96 horas após a aplicação do tratamento de deficiência de nitrogênio (Figura 4B).

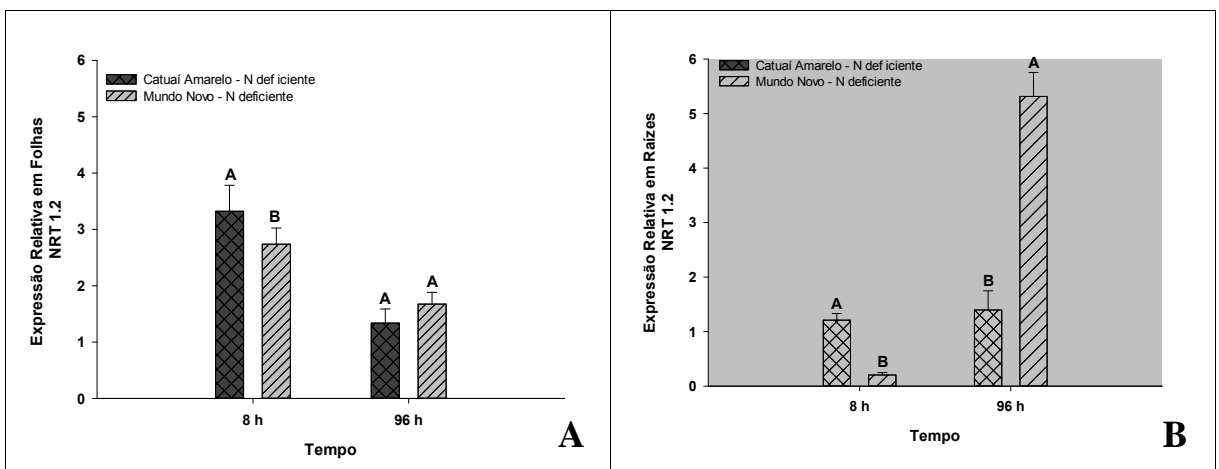


Figura 4: Expressão relativa do gene transportador de N (NRT1.2) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo, submetidas a deficiência de nitrogênio, em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o

erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

O gene NRT 3.2 foi expresso com variação na folha e raiz inferior a 4, no estresse hídrico e de nitrogênio em ambas as cultivares e nos dois tempos de avaliação, com exceção da maior expressão no sistema radicular da cultivar Mundo Novo em condição de déficit hídrico (Figura 5 e 6). A expressão deste gene na folha foi maior na cultivar Catuaí Amarelo após 96 horas em condição de déficit hídrico e não se diferenciou entre as cultivares quando avaliadas às 8 horas após o início da condição de déficit (Figura 5A). A expressão avaliada no sistema radicular mostrou valores superiores na cultivar Mundo Novo após 96 h (Figura 5B).

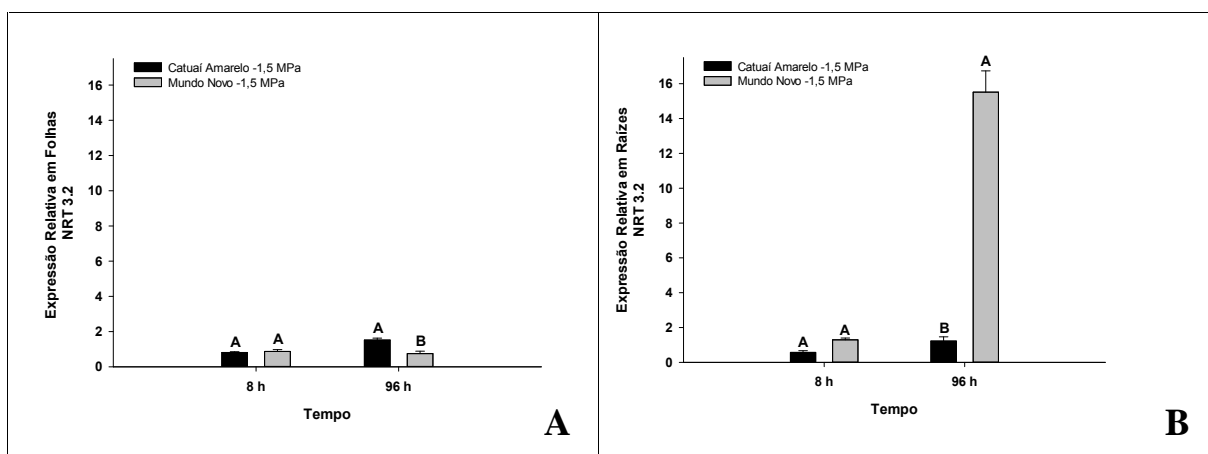


Figura 5: Expressão relativa do gene transportador de N (NRT3.2) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo, submetidas ao déficit hídrico de -1,5 MPa (potencial hídrico na solução da nutritiva ($|\Psi_w|$ -1,5 MPa), em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Na condição de deficiência de nitrogênio a cultivar Mundo Novo mostrou-se superior na expressão do gene NRT 3.2 nas folhas 8 e 96 horas após a imposição da condição de redução da disponibilidade de nitrogênio (Figura 6A). No sistema radicular ocorreu expressão do gene superior na cultivar Catuaí quando avaliou-se as plantas decorrido 8 horas destas em déficit de nitrogênio (Figura 6B). Após 96 horas na condição de deficiência de nitrogênio as plantas de café apresentaram expressão do gene NRT 3.2 nas raízes que não de diferiu entre as cultivares (Figura 6B).

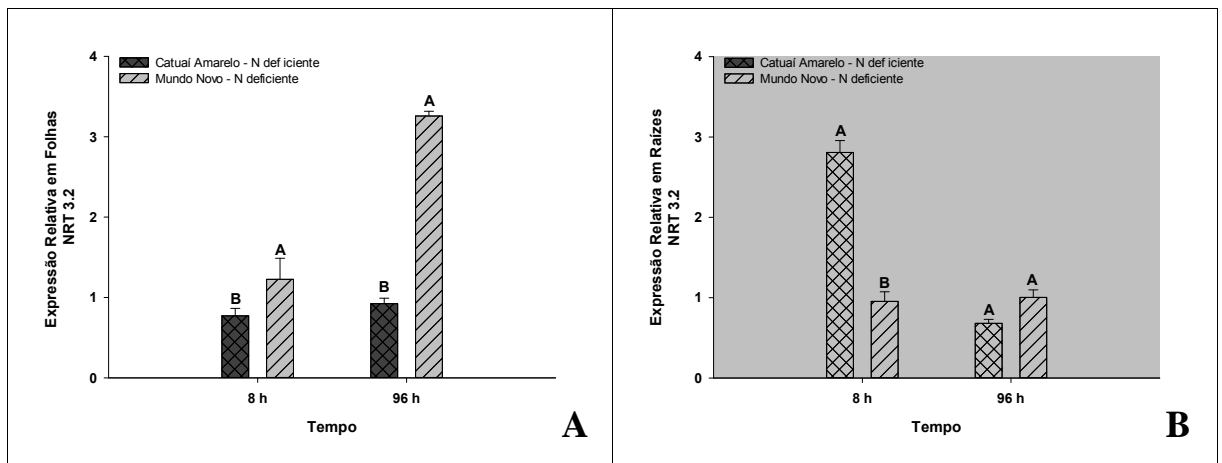


Figura 6: Expressão relativa do gene transportador de N (NRT3.2) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo, submetidas a deficiência de nitrogênio, em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Em condições de reduzida disponibilidade de água a expressão relativa do gene NIA2 em folhas foi maior na cultivar Catuaí Amarelo nos dois tempos estudados (Figura 7A). Entretanto, a expressão na raiz às 96 horas após a aplicação do tratamento da cultivar Catuaí Amarelo foi inferior a cultivar Mundo Novo (Figura 7B).

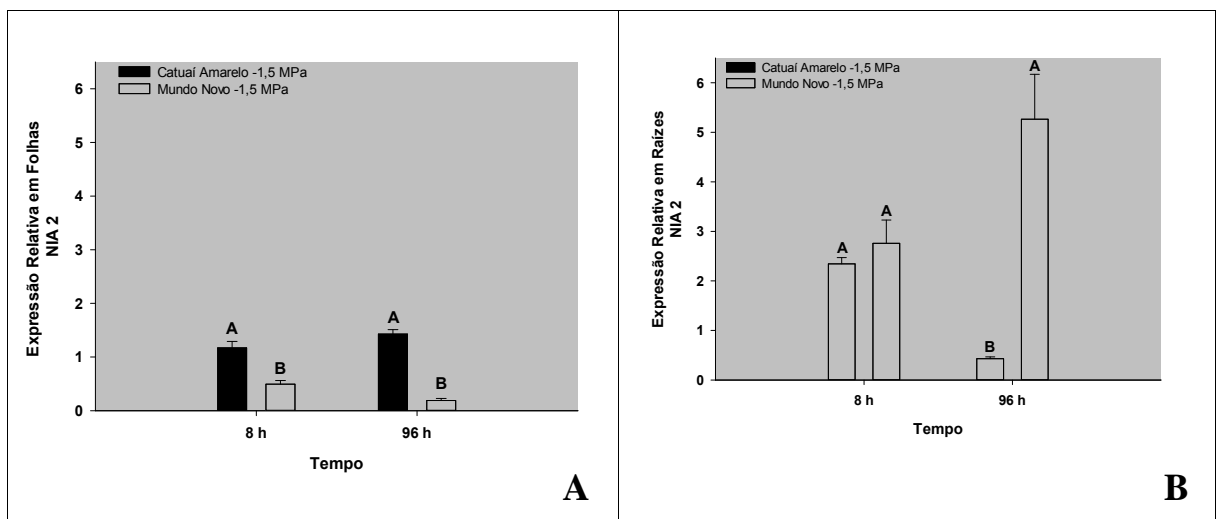


Figura 7: Expressão relativa do gene relacionado ao metabolismo do N NIA2 Síntese da enzima Nitrito Redutase (NR) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo, submetidas ao déficit hídrico de -1,5 MPa (potencial hídrico na solução da nutritiva ($|\Psi_w|$ -1,5 MPa), em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Na condição de deficiência de nitrogênio, no tempo de 8 horas após a aplicação do tratamento, as cultivares não mostraram diferença na expressão de NIA2 nos tecidos

foliares. Em 96 h após a imposição da deficiência de N, Catuaí Amarelo mostrou uma maior expressão de NIA2 nas folhas (Figura 8A). No sistema radicular houve maior expressão da cultivar Mundo Novo 96 horas após o início da condição de deficiência de nitrogênio (Figura 8B).

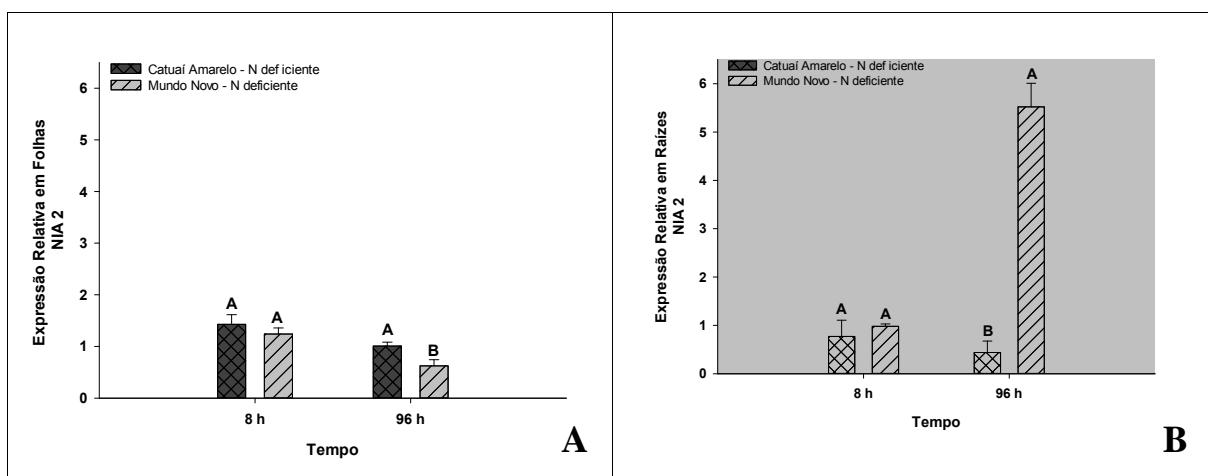


Figura 8: Expressão relativa do gene relacionado ao metabolismo do N NIA2 Síntese da enzima Nitrito Redutase (NR) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo, submetidas a deficiência de nitrogênio, em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Esse gene é responsável pela produção da enzima nitrito redutase, importante enzima do ciclo do nitrogênio, o mesmo é um gene estrutural e o seu nível de transcrição é controlado pela luz. A atividade desta enzima depende de NADH, sendo que o RNA mensageiro (mRNA), do gene NIA 2 em *Arabidopsis*, tem a sua transcrição induzida pelo nitrito (Konishi & Yanagisawa, 2011), mas não é um pré-requisito absoluto para a expressão do gene (Mazidet al., 2012). Desta forma, o déficit hídrico e a deficiência de N aumentaram a expressão do gene NIA e conseqüentemente também aumentou a abundância do seu mRNA, tanto na parte aérea como no sistema radicular de mudas de café. Assim, o aumento na expressão relativa do gene NIA2 que atua na síntese da enzima nitrito redutase, sugere que a concentração de nitrito em solução e a deficiência hídrica nas plantas pode exercer um controle transcricional deste gene (Lian et al., 2005). A maior indução do gene NIA2 na cultivar Mundo Novo, 96 h após aplicação dos tratamentos, pode indicar medida adaptativa, e nessas condições de estresses haveria aumento da redução do nitrito em seu sistema radicular.

A expressão do gene GLT apresentou variação até aproximadamente 2,6, obtendo valores superiores somente a cultivar Mundo Novo às 96 horas após a aplicação da deficiência hídrica e de nitrogênio (Figura 9 e 10). A cultivar Mundo Novo obteve maior expressão do gene GLT na folha nos dois tempos de avaliação (Figura

9A). A mesma cultivar também apresentou valores superiores na raiz no tempo de 96 horas de déficit hídrico (Figura 9B).

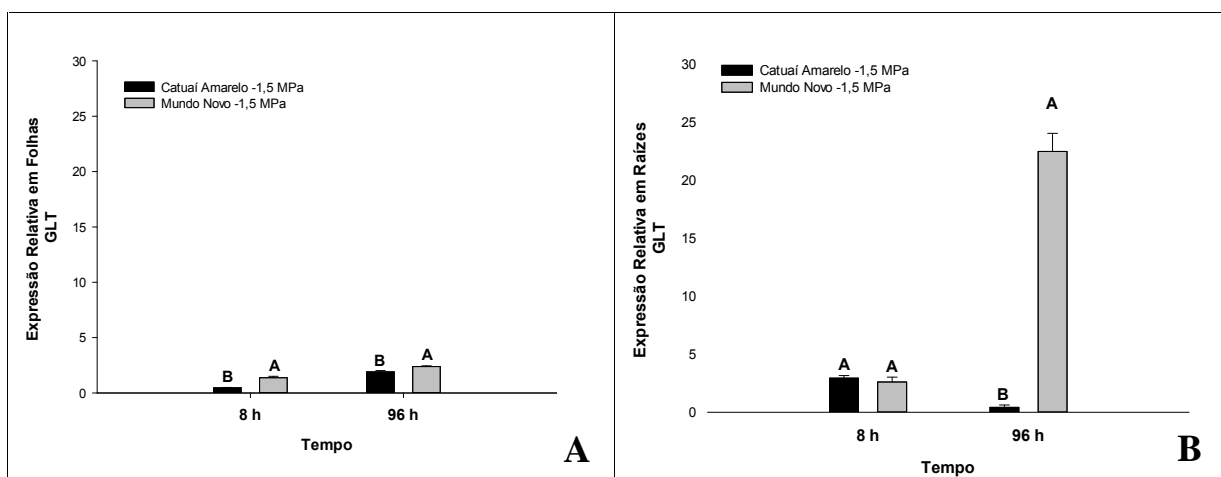


Figura 9: Expressão relativa do gene relacionado ao metabolismo do N GLTA Síntese da Glutamina Oxoglutarato Aminotransferase (GOGAT) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo, submetidas ao déficit hídrico de -1,5 MPa (potencial hídrico na solução da nutritiva $|\Psi_w|$ -1,5 MPa), em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Os valores da expressão do gene GLT das cultivares em deficiência de nitrogênio foram inferiores a 2, sendo superior a esse valor somente a expressão na cultivar Mundo Novo aos 96 horas (Figura 10). Nas folhas a deficiência de nitrogênio resultou em maior expressão do gene GLT na cultivar Catuaí Amarelo e não foi observado diferença entre as cultivares no tempo de 8 horas de deficiência (Figura 10A). A cultivar Mundo Novo apresentou expressão superior no sistema radicular se comparada a cultivar Catuaí Amarelo após 96 horas de duração do tratamento de deficiência de nitrogênio (Figura 10B).

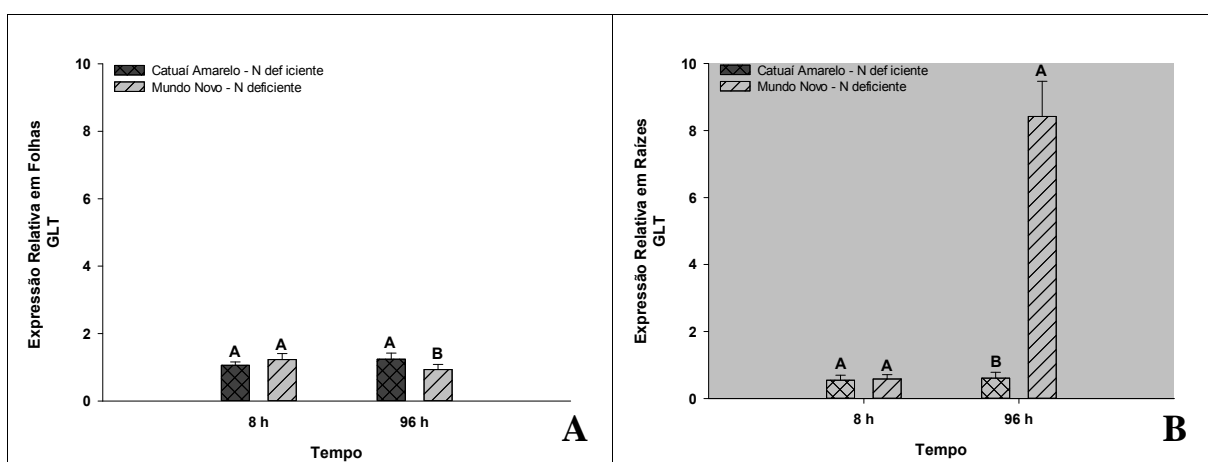


Figura 10: Expressão relativa do gene relacionado ao metabolismo do N GLTA Síntese da Glutamina Oxoglutarato Aminotransferase (GOGAT) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de

café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo, submetidas a deficiência de nitrogênio, em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

O gene *GTL1* codifica para a enzima glutamato sintase (GOGAT) que catalisa a conversão, dependente de poder redutor, de glutamina e 2-oxoglutarato em duas moléculas de glutamato. A isoforma da GOGAT codificada por este gene, dependente de NADH, em *Arabidopsis* é encontrada principalmente em tecidos não fotossintéticos como sementes e raízes (Irland & Lea, 1999). Em cafeeiro foi encontrado o mRNA do gene *GLT1* que codifica para esta enzima tanto em raízes como em folhas, o que sugere a presença desta enzima em tecidos fotossintetizantes e não fotossintetizantes do café.

O gene *GLN 1.3* foi expresso nas cultivares Mundo Novo e Catuaí Amarelo com variação de até aproximadamente 3 em condição de déficit hídrico (Figura 11). A cultivar Mundo Novo apresentou expressão superior a cultivar Catuaí Amarelo na avaliação realizada 96 horas após a aplicação do tratamento de déficit hídrico (Figura 11A). No sistema radicular não foi constatada diferença entre as cultivares independentemente do tempo analisado (Figura 11B).

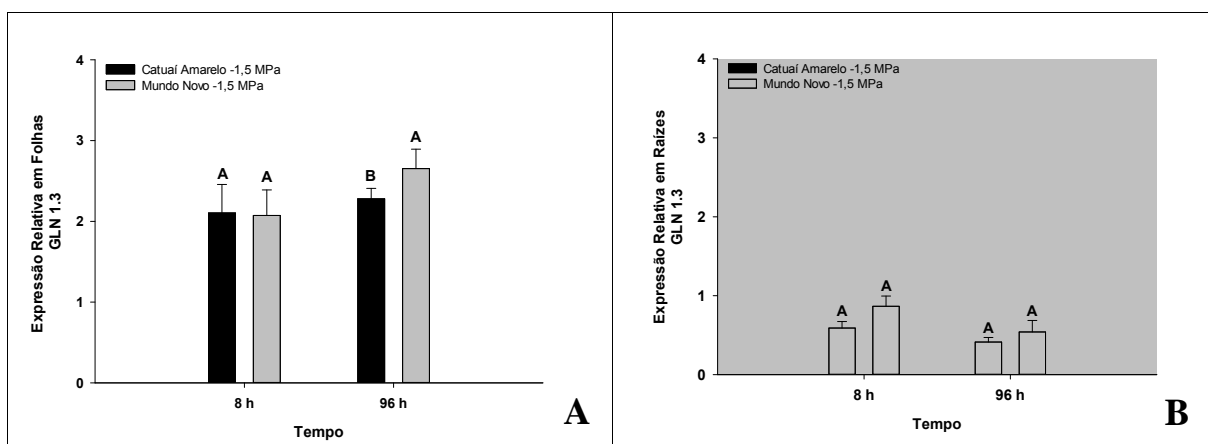


Figura 11: Expressão relativa do gene relacionado ao metabolismo do N Síntese da Glutamina Sintetase (GS) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo, submetidas ao déficit hídrico de -1,5 MPa (potencial hídrico na solução da nutritiva ($|\Psi_w|$ -1,5 MPa), em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

A outra isoforma da GOGAT é dependente de ferredoxina e sua expressão é baixa em tecidos radiculares e mais abundante em folhas. A atividade de NADH-GOGAT é 2-25 vezes mais baixa do que a de Fd-GOGAT (Suzuki et al., 2001). Estudos

genéticos de *gls* (mutantes para o gene *Fd-GOGAT*) em *Arabidopsis* mostraram que *NADH-GOGAT* foi incapaz de substituir a deficiência de *Fd-GOGAT*, sugerindo que *NADH-GOGAT* realiza uma função metabólica distinta. Foi proposta função de *NADH-GOGAT* na exportação de glutamina de tecidos e raízes senescentes para o floema. Também foi sugerido que *NADH-GOGAT* tem papel importante na assimilação de nitrogênio primário no sistema radicular da planta (Ishiyama et al., 1998). O aumento na expressão desse gene nas cultivares *Catuai Amarelo* e *Mundo Novo* em condições de estresse hídrico e nutricional pode indicar uma possível estratégia das plantas de café para exportar glutamina das raízes e folhas completamente expandidas para outras partes da planta.

A expressão do gene *GLN 1.3* nas cultivares em condição de deficiência de nitrogênio não ultrapassou o valor de 2 nas avaliações das folhas e do sistema radicular nos dois tempos de duração da deficiência (Figura 12). Nas folhas observou-se maior expressão na cultivar *Mundo Novo* com 8 horas de deficiência e na cultivar *Catuai Amarelo* com 96 horas (Figura 12A). A cultivar *Catuai Amarelo* mostrou menor expressão do gene *GLN 1.3* 8 horas depois da aplicação da deficiência (Figura 12B).

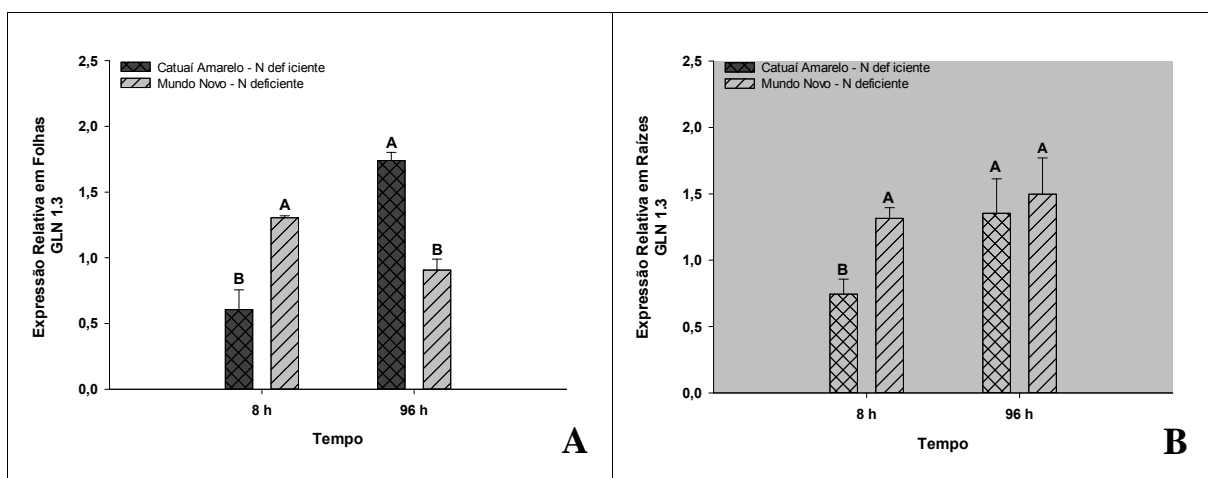


Figura 12: Expressão relativa do gene relacionado ao metabolismo do N Síntese da Glutamina Sintetase (*GS*) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café das cultivares *Catuai Vermelho* e *Mundo Novo*, submetidas a deficiência de nitrogênio, em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação do tratamento. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do tratamento estresse hídrico, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

O gene *GLN1.3* que codifica para a enzima *GS* (Glutamina Sintetase), responsável pela assimilação do NH_4^+ e relacionada à remobilização de N, foi estudada em diversas culturas (Martin et al., 2006; Unno et al., 2006; Tabuchi et al., 2007) nas quais foram observados que aumentos na atividade da *GS* se relacionaram com a maior eficiência nutricional quanto a N. Assim, maiores atividades de *GS* estão associadas a variedades

mais eficientes nutricionalmente na utilização de N, no que tange sua absorção e utilização. O efeito na absorção é explicado, de forma indireta, visto que a diminuição na concentração de glutamina aumenta a síntese de transportadores de alta afinidade, na raiz, modulando assim essa absorção (Sivasankar et al., 1997). Já a eficiência de utilização está relacionada com a maior capacidade de assimilação do N-NH₄⁺, evitando possíveis intoxicações, e a retranslocação de N na planta, aumentando a EUN (Hirel & Lea, 2001).

Os aumentos observados na expressão de GLN1.3 nas cultivares estudadas, indicam uma estratégia das plantas em aumentar os transcritos do mesmo e assim, possivelmente, aumentar a atividade da GS. A consequência do aumento da GS seria elevar a eficiência de utilização do N em condições de déficit hídrico e deficiência de N, já que as duas condições levam a menor disponibilidade de N para a planta.

Em geral, para todos os genes de transporte e metabolismo, observou-se que a cultivar Mundo Novo apresentou maior expressão relativa desses genes em condições de estresse hídrico moderado. Esta pode ser uma estratégia dessa cultivar para se adaptar às condições de estresse hídrico imposta, pois como observou-se no experimento de cinética de absorção (Tabela 4) desse trabalho, esta cultivar manteve constante os parâmetros da cinética de absorção de NO₃⁻ (V_{max} , K_m e C_{min}). Esses resultados sugerem, que este pode ser o mecanismo utilizado por este material genético para manter sua velocidade de absorção de NO₃⁻ e tolerar bem as condições de estresse hídrico moderado.

4. CONCLUSÕES

Considerando as variações observadas na cinética de absorção, a cultivar Catuaí Amarelo apresentou melhor adaptação às condições de estresse hídrico moderado.

As cultivar Mundo Novo apresentou regularidade nos parâmetros de cinética de absorção em suficiência hídrica e déficit hídrico moderado.

Em déficit hídrico moderado a cultivar Catuaí Vermelho sofre grande redução na V_{max} , mas compensa o declínio com redução nos parâmetros K_m e C_{min} .

Quando o déficit hídrico foi imposto, os genes NRT1.2, NRT3.2, NIA2 e GLT, apresentaram maior transcrição diferencial no sistema radicular das plantas.

O gene GLN1.3 apresentou maior expressão na parte aérea das plantas em condições de reduzida disponibilidade de água.

O estresse hídrico provocou maior expressão relativa dos genes estudados do que o tratamento com deficiência de N. Sendo que as maiores alterações na expressão diferencial dos genes foram observadas no sistema radicular das plantas.

De maneira geral, a expressão relativa dos genes estudados foi maior na cultivar Mundo Novo comparativamente a cultivar Catuaí Amarelo, em condições de déficit hídrico e deficiência de N por curto prazo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali L. Differential potassium influx in fluences growth of two cotton varieties in hydroponics. *Pakistan Journal of Botany*, Karachi, v. 42, n. 2, p. 943-953, apr. 2010
- Anghinoni I, Volkart CR, Fattore N, Ernani PR. Morfologia de raízes e cinética da absorção de nutrientes em diversas espécies e genótipos de plantas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 13, n. 3, p. 355-361, set./dez. 1989
- Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:601-639, 1999
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC. Comparative induction of nitrate and nitrite uptake and reduction systems by ambient nitrate and nitrite in intact roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology*, v.102, p.811-819, 1993
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Plant Physiology*, v.99, n.3, p.1124-1133, 1992
- Bataglia OC, Furlani AMC, Teixeira JPF, Furlani PR, Gallo JR. Métodos de análise química de plantas. Campinas: Instituto Agrônômico (Boletim Técnico, 78), 48p, 1983
- Bouwman AF, Boumans LJM, Batjes NH. Emissions of N₂O and NO from fertilized fields: Summary of available measurement data, *Global Biogeochem. Cycles*, 16, 2002
- Brix H. Can differences in phosphorus uptake kinetics explain the distribution of cattail and sawgrass in the Florida Everglades? *BMC Plant Biology*, London, v.10, n.23, p. 1-14, feb. 2010
- Claassen N & Barber SA. A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. *Plant Physiology*, Illinois, v. 54, n. 4, p. 564-568, oct. 1974
- Camargo A, Llamas A, Schnell RA, Higuera JJ, GonzalezBallester D, Lefebvre PA, Fernandez E, Galvan A. Nitrate signaling by the regulatory gene NIT2 in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 19, 3491–3503, 2007

Davies DB & Silvester-Bladley, R. The contribution of fertilizer nitrogen to leachable nitrogen in the UK: a review. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 68, 399–406. 1995

Doane TA & Horwath WR. Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. *Analytical Letters* 36(12):2713-2722. Marcel Dekker Publishing. 2003

Fernandes MS & Souza SR. Absorção de nutrientes. In: Fernandes M. S. (Org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 115-152, 2006

Foley JA, Ramankutty N, Brauman K, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O'connell C, Ray DK, West PC, Balzer C, Bennett EM, Carpenter SR, Hill J, Monfreda C, Polasky S, Rockström J, Sheehan J, Siebert S, Tilman D et al. Solutions for a cultivated planet. *Nature*, v. 478, p. 337–342, 2012

Franco AC & Lüttge U. Midday depression in savanna trees: coordinated adjustments in photochemical efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia*, 131:356-365, 2002

Franco AC, Matsubara S, Orthen B. Photoinhibition, carotenoid composition and the co-regulation of photochemical and non-photochemical quenching in neotropical savanna trees. *Tree Physiology*, 27:717-725, 2007

Furtini Neto, A. E. Efeito do enxofre no crescimento e assimilação de nitrogênio por diferentes espécies de eucalipto. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 95 p, 1988.

Furtini Neto AE, Barros NF, Godoy MF, Novais RF. Eficiência nutricional de mudas de *Eucalyptus* em relação a fósforo. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 20, n.1, p. 17-28, 1996

Gojon A, Nacry P, Davidian JC. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol*, 12:328-338, 2009

Gonzalez-Dugo V, Durand JL, Gastal F. Water deficit and nitrogen nutrition of crops, a review. *Agron. Sustainable Dev*, 30, 529–544, 2010

Guimarães PTG, Garcia AWR, Alvarez Viegas VH, Prezotti LC, Viana AS, Miguel AE, Malavolta E, Corrêa JB, Lopes AS, Nogueira FD, Monteiro AVC. Cafeeiro. In: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez Viegas VH. (Ed.). *Recomendações para o uso de*

corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5a aproximação. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, p. 289-302. 1999

Hirel B, Berlin P, Quillere I. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in Maize. *Plant Physiology* 125, 1258–1270. 2001

Hirel B & Lea PJ. Ammonium assimilation. In: Lea PJ, MorotGaudry J. F., eds. *Plant nitrogen*. Berlin: Springer-Verlag, 79–99. 2001

Horn D, Ernani PR, Sangoi L, Schweitzer C, Cassol PC. Parâmetros cinéticos e morfológicos da absorção de nutrientes em cultivares de milho com variabilidade genética contrastante. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 30, n. 1, p. 77-85, fev. 2006

Ishiyama K, Hayakawa T, Yamaya T. Expression of NADH-dependent glutamate synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to the supply of ammonium ions. *Planta*, 204, 288–294, 1998

Konishi M & Yanagisawa S. The regulatory region controlling the nitrate responsive expression of a nitrate reductase gene, NIA1, in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, Kyoto, v. 52, n. 5, p. 824-836, 2011

Lawlor DW, Gastal F, Lemaire G. Nitrogen, plant growth and crop yield. In: LeaPJ, Morot-Gaudry J-F, eds. *Plant nitrogen*. Berlin: Springer-Verlag, 343-367, 2001

Lian X, Xing Y, Xu HYC, Li X, Zhang Q. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. *Theor. Appl. Genet*, 112:85–96, 2005

Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot*, 47: 239–247, 2002

Liu KH, Huang CY, Tsay YF. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell*, 11: 865–874, 1999

Marschner, H. *Mineral nutrition of higher plants*. 3. ed. San Diego: Academic Press, 651, 2012

- Martin A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dubois F, Balliau T, Valot B, Davanture M, Tercé-Laforgue T, Quilleré I, Coque M, Gallais A, Gonzalez-Moro MB, Bethencourt L, Habash DZ, Lea PJ, Charcosset A, Perez P, Murigneux A, Sakakibara H, Edwards KJ, Hirel B. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize (*Zea mays* L.) are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell*, 18:3252–3274, 2006
- Mazid M, Khan TA, Mohammad F. Role of nitrate reductase in nitrogen fixation under photosynthetic regulation. *World Journal of Pharmaceutical Research*, Sofia, v. 1, n. 3, p. 386-414, 2012
- McDonald A JS & Davies WJ. Keeping in touch: responses of the whole plant to deficits in water and nitrogen supply. *Advances in Botanical Research* 22, 229–300. 1996
- Morey KJ, Ortega JL, Sengupta-Gopalan C. *Plant Physiol.* 128, 182-93, 2002
- Nielsen NE & Barber SA. Differences among genotypes of corn in the kinetics of P uptake. *Agronomy Journal*, Madison, v. 70, n. 5, p. 695-698, Sept./Oct. 1978
- Noctor G, De Paepe R, Foyer CH. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 12, 125–134, 2007
- Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM. Regulation of NRT1 and NRT2 Gene Families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to Nitrate Provision, *Plant Cell Physiol* 44 (3): 304-31, 2003
- Peoples MB, Herridge DF, Ladha JK. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil* 174:3–28, 1995
- Price J, Laxmi A, Martin SK, Jang JC. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*; 16:2128-2150, 2004
- Rocha JG, Ferreira LM, Tavares OCH, Santos AM, Souza SR. Cinética de absorção de nitrogênio e acúmulo de frações solúveis nitrogenadas e açúcares em girassol. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 44, n. 4, p. 381-390, 2014
- Rockström J, Steffen W, Noone K, Persson A, Chapin FS, Lambin EF, Lenton TM, Scheffer M, Folke C, Schellnhuber HJ, Nykvist B, de Wit CA, Hughes T, Van Der

Leeuw S, Rodhe H, Sörlin S, Snyder PK, Costanza R, Svedin U, Falkenmark M. A safe operating space for humanity. *Nature*, v. 461, p. 472–475, 2009

Ruiz HÁ & Fernandes Filho, E. I. Cinética: Software para estimar as constantes V_{max} e K_m da equação de Michaelis-Menten. In: Reunião Brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas, 10, 1992. Piracicaba. Anais... Piracicaba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 124-125

Ruiz H.A. Estimativa dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} por uma aproximação gráfico- matemática. *R. Ceres*, 32:79-84, 1985

Salinas JG & Sanchez P. Soil plant relationship affecting varietal and species differences in tolerance to low available soil phosphorus. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 156-168, Feb. 1976

Schoninger EL, Gatiboni LC, Ernani PR. Fertilização com fosfato natural e cinética de absorção de fósforo de soja e plantas de cobertura do cerrado. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 1, p. 95-106, jan./fev. 2013

Siddiqi MY, Glass ADM, Ruth TJ, Rufty T. Studies of the uptake of nitrate in barley: I. Kinetics of $^{13}NO_3^-$ influx. *Plant Physiology*, v.93, p.1426-1432, 1990

Srivastava AK. & Singh S. Biochemical markers and nutrient constraints diagnosis in citrus: a perspective. *J. Plant Nutr.*, 29:827-855, 2006

Suzuki A, Vergnet C, Morot-Gaudry JF, Zehnacker C, Grosclaude J. Immunological characterization of ferredoxin and methyl viologen interaction domains of glutamate synthase using monoclonal antibodies. *Plant Physiol. Biochem.* 32, 619, 1994

Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T. Assimilation of ammonium-ions and re-utilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 8: 2319-2327, 2007

Unno H, Uchida T, Sugawara H, Kurisu G, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H, Hase T, Kusunoki M. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J. Biol. Chem.*, 281:29287-29296, 2006

Villela FA, Beckert OP Potencial osmótico de soluções aquosas de polietileno 482 glicol 8000. *Rev Bras Sementes*, 23:267-275, 2001

Wang X, Bian Y, Cheng K, Zou H, Sun SSM, He JX. A Comprehensive Differential Proteomic Study of Nitrate Deprivation in *Arabidopsis* Reveals Complex Regulatory Networks of Plant Nitrogen Responses. *J. Proteome Res.*, 11, 2301–2315, 2012

Wilson K & Walker K. Principles and techniques of practical biochemistry. 5^a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 784 p., 2000

CAPITULO II

**TROCAS GASOSAS EM CULTIVARES DE *COFFEA ARABICA*
INFLUENCIADAS PELO DÉFICIT HÍDRICO E DEFICIÊNCIA DE
NITROGÊNIO.**

RESUMO

SOUZA, Bruna Pereira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Trocas gasosas em cultivares de *Coffea arabica* influenciadas pelo déficit hídrico e deficiência de nitrogênio.** Orientadora: Hermínia Emília Prieto Martinez. Coorientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Marcelo Ehlers Loureiro.

Na agricultura moderna os fertilizantes nitrogenados inorgânicos são usados extensivamente para melhorar o rendimento e a produtividade de culturas agrícolas. No entanto, a prática de fertilização ainda provoca perdas de N em excesso, o que resulta em baixa eficiência do uso e contaminação das águas subterrâneas com nitratos e da atmosfera, com o óxido de nitrogênio derivado de nitrato. Os produtores rurais são desafiados a otimizar o crescimento da planta e melhorar as eficiências uso da água e do N (EUA e EUN, respectivamente) em condições de seca e déficit de N. Nas principais áreas brasileiras de cultivo de café Arabica longos períodos sem chuvas são frequentemente observados. Desta forma, objetivou-se com esta pesquisa avaliar a influencia da adubação nitrogenada e do déficit hídrico nas características fisiológicas relacionadas à fotossíntese e fluorescência da clorofila *a* de cultivares de café. Para alcançar os objetivos propostos foi realizado o seguinte experimento: cinco cultivares de café foram submetidas aos seguintes tratamentos: N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem déficit hídrico (tratamento controle), N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) com déficit hídrico (-1,5 MPa) e N-deficiente (-N, 0,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem déficit hídrico, para avaliar as características fisiológicas relacionadas com a fotossíntese. O déficit hídrico foi imposto pela aplicação de polietileno glicol 8000. O experimento foi montado em esquema fatorial 3x5, sendo três tratamentos e cinco cultivares de café arábica, o delineamento utilizado foi em blocos casualizados com três repetições. Avaliaram-se as características fisiológicas e de fluorescência da clorofila *a* de cultivares de café. O déficit hídrico afetou o potencial hídrico foliar, a fotossíntese líquida, condutância estomática, eficiência do uso da água, taxa de transporte de elétrons, eficiência quântica do FSII e eficiência fotoquímica máxima do FSII das mudas de café reduzindo-as durante o período avaliado. Já para o tratamento com deficiência de nitrogênio, apenas as variáveis taxa de transporte de elétrons, eficiência quântica do FSII e eficiência fotoquímica máxima do FSII das mudas de café foram afetadas e também apresentaram redução. A deficiência de N causou menores danos ao aparelho fotossintético das plantas que o déficit hídrico.

ABSTRACT

SOUZA, Bruna Pereira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2015. **Gas exchange in *Coffea Arabica* cultivars influenced by drought and nitrogen deficiency.** Adviser: Hermínia Emília Prieto Martinez. Co-advisers: Eveline Teixeira Caixeta and Marcelo Ehlers Loureiro.

In modern agriculture nitrogen fertilizers are used extensively to improve the yield and productivity of agricultural crops. However, the practice of fertilization also causes losses of N in excess, resulting in low efficiency of use and contamination of groundwater with nitrates and atmosphere, with the nitrogen oxide-derived nitrate. Water stress is the main limiting factor for the global agriculture and the limitation is greatly exacerbated by N deficiency. Farmers are challenged to optimize plant growth and improve the efficiency of water use and N use (WUE and NUE, respectively) under conditions of drought and deficit of N. In the major areas of Brazilian coffee growing long periods without rain are often observed. Thus, the aim of this research was to evaluate the influence of nitrogen fertilization and water stress on physiological characteristics related to photosynthesis and chlorophyll fluorescence of coffee cultivars. To achieve the proposed objectives the following experiment was conducted: five coffee cultivars were submitted to the following treatments: N-sufficient (N +, 5.0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) without water deficit (control), N-sufficient (N +, 5.0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) with water deficit (-1.5 MPa) and N deficient (-N, 0.0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) without drought, to assess physiological characteristics associated with photosynthesis. The drought was imposed by applying polyethylene glycol 8000. The experiment was performed in factorial 3x5, with three treatments and five cultivars of arabica coffee, the design was a randomized block design with three replications. We evaluated the physiological characteristics and chlorophyll fluorescence of coffee varieties. The drought affected the leaf water potential, net photosynthesis, stomatal conductance, water use efficiency, electron transport rate, quantum efficiency of PSII and photochemical efficiency of PSII of coffee seedlings reducing them during the evaluation period. For the treatment with nitrogen deficiency, only the variables electron transport rate, quantum efficiency of PSII and photochemical efficiency of PSII of coffee seedlings were affected and also decreased. Nitrogen deficiency caused minor damage to the photosynthetic apparatus of plants than water deficit.

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) está disponível no solo para as plantas em uma variedade de formas, incluindo nitrato, amônio, ureia, aminoácidos e peptídeos. As formas na maioria das plantas superiores, incluindo o cafeeiro, obtém o N são nitrato ou amônio. Em solos bem arejados o amônio é rapidamente oxidado a nitrato por bactérias nitrificantes, portanto, plantas que crescem em tais solos absorvem praticamente apenas nitrato (Crawford & Forde, 2002).

O N, além de ser um nutriente essencial para as plantas, é um constituinte de proteínas, ácidos nucleicos, e muitos componentes celulares importantes, tais como clorofila e vários hormônios, portanto. Além disso, sabe-se que o nitrato serve também como uma molécula de sinalização que rapidamente desencadeia mudanças na expressão genética, metabolismo e crescimento em plantas (Alboresi et al., 2005), induz a expansão da foliar (Walch-Liu et al., 2000) e regula o desenvolvimento de raízes laterais. Segundo Zhang & Forde (2000) quando em altas concentrações o nitrato afeta a morfologia radicular por suprimir o crescimento das raízes. Por outro lado, quando em baixas concentrações aumenta o crescimento radicular independentemente da assimilação do N e coordena a expressão de genes relacionados com o nitrato (Ho et al., 2009).

A deficiência hídrica é o principal fator limitante para a agricultura global e a limitação é grandemente agravada pela deficiência de N (Shangguan et al, 2000; Gonzalez-Dugo et al., 2010). Os produtores rurais são desafiados a otimizar o crescimento da planta e melhorar as eficiências uso da água e do N (EUA e EUN, respectivamente) em condições de seca e déficit de N (Wu et al., 2008). Nas principais áreas brasileiras de cultivo de café Arabica longos períodos sem chuvas são frequentemente observadas. A seca é considerada como o principal fator limitante para o cultivo de café nessas áreas. As condições de seca afetam o crescimento e produtividade da cultura, em parte, através de reduções na taxa de assimilação líquida de carbono (A), seja por um efeito direto da desidratação sobre o aparato fotossintético ou em decorrência do efeito indireto do fechamento dos estômatos. Além disso, o falta de água pode levar a deficiência de nutrientes, em parte porque a água proporciona o meio para a absorção da maioria dos elementos minerais pelas raízes (DaMatta et al., 2002).

Respostas morfológicas e fisiológicas das plantas à água no solo e / ou disponibilidade de N têm recebido considerável atenção nas últimas décadas. Embora

existam algumas divergências (Heitholt, 1989; Ashraf et al., 2001), Tanto a taxa fotossintética como a taxa transpiratória são significativamente afetados pela falta de água e / ou N em uma variedade de espécies, tanto em nível de folha como em escala de planta inteira, bem como em termos de área foliar (Borghi, 2000; Wu et al., 2008). Tanto disponibilidade como à eficiência com que os nutrientes minerais são usados no aparato fotossintético são fatores importantes que afetam A.

Na maioria das plantas cultivadas o nutriente mineral com maior potencial para limitar A é o N (Evans, 1989). A falta desse macronutriente pode limitar a A por meio da redução do teor de pigmentos cloroplastidiais e também por afetar a síntese de várias enzimas envolvidas no ciclo de Calvin, particularmente da ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase (Rubisco) (Terashima & Evans, 1988). Além disso, estudos têm evidenciado que a carência de N diminui o rendimento quântico do fotossistema II (PSII), a taxa de transporte de elétrons e a eficiência fotoquímica máxima PSII (Lu & Zhang, 2000), indicando que o déficit de N pode causar danos à fotoquímica PSII. Todavia em torno de 75% do N foliar é atribuído ao aparato fotossintético, portanto, a correlação entre a A e a concentração de N foliar é bastante forte (Evans, 1989).

Dessa forma, o presente trabalho visou avaliar as características fisiológicas nestas durante o período de déficit hídrico e restrição de N.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Material vegetal, condições de cultivo:

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 metros de altitude), Minas Gerais.

No experimento 1 foram utilizadas as cultivares: cultivares Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 44, Acauã, Catucaí Amarelo 2SL e Mundo Novo IAC 379-19. As plantas foram obtidas a partir de sementes previamente germinadas em condições controladas. Inicialmente removeu-se o pergaminho das sementes e em seguida elas foram tratadas com hipoclorito de sódio 5 % por 15 minutos para controle de possíveis patógenos. Logo após foram lavadas três vezes com água destilada. Em seguida, 25 sementes foram colocadas para germinar em papel germiteste umedecido com água destilada e mantidas em a temperatura de 30 °C em germinador por 40 dias.

Posteriormente, as plantas foram aclimatadas em casa de vegetação por quatro semanas em caixas de 32 L contendo 30 L de solução nutritiva e 60 plântulas por caixa.

Os nutrientes aplicados em solução nutritiva eram provenientes de sais puros para análise e apresentavam as seguintes concentrações: 5,0 mmol L⁻¹ NO₃⁻, 0,5 mmol L⁻¹ P, 3,25 mmol L⁻¹ K, 1,0 mmol L⁻¹ Mg, 2,25 mmol L⁻¹ Ca, 2,125 mmol L⁻¹ S, 23 μmol L⁻¹ B, 0,3 μmol L⁻¹ Cu, 80 μmol L⁻¹ Fe, 12 μmol L⁻¹ Mn, 0,3 μmol L⁻¹ Mo e 1,0 μmol L⁻¹ Zn. A solução inicial foi de ½ força, com aeração constante e pH mantido em torno de 5,7 ± 0,3.

Após a aclimatação as plantas foram mantidas em caixas contendo 30 L de solução nutritiva e 15 plantas por caixa. A composição da solução nutritiva foi a descrita acima, foi mantida aeração constante nas caixas e a solução renovada a cada vinte dias. As plantas foram mantidas nessas condições por um período de 240 dias, para o crescimento.

Quando as plantas apresentavam aproximadamente 28 cm de altura, onze pares de folhas e já emitindo ramos plageotrópicos foram transferidas para uma câmara de crescimento com temperatura controlada (23-24 °C), luminosidade de 200 μmol m⁻² s⁻¹ e umidade relativa entre 56-58 % e submetidas ao fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro). As plantas foram transferidas para vasos contendo 1,0 L de solução nutritiva. Cada vaso contendo duas plantas consistiu uma unidade experimental.

Nos primeiros 15 dias as plantas foram cultivadas em solução nutritiva, sem aplicação dos tratamentos para as plantas se adaptarem ao ambiente, com as seguintes concentrações: 5,0 mmol L⁻¹ NO₃⁻, 0,5 mmol L⁻¹ P, 3,25 mmol L⁻¹ K, 1,0 mmol L⁻¹ Mg, 2,25 mmol L⁻¹ Ca, 2,125 S, 23 μmol L⁻¹ B, 0,3 μmol L⁻¹ Cu, 80 μmol L⁻¹ Fe, 12 μmol L⁻¹ de Mn, 0,3 μmol L⁻¹ Mo e 1,0 μmol L⁻¹ Zn.

Aos 15 dias, após a adaptação das plantas ao ambiente, iniciou-se a imposição da deficiência hídrica em sistema hidropônico, um terço dos vasos receberam polietileno glicol (PEG 8000) para imposição da deficiência hídrica, a dose aplicada foi de 355 g L⁻¹ (Villela & Beckert, 2001) aplicada de forma gradativa durante quatro dias, obtendo-se ao final da aplicação um potencial hídrico de -1,5 MPa. Após este período a solução nutritiva de todos os vasos foi trocada, os vasos que receberam PEG 8000, receberam novamente solução nutritiva com a dose de PEG 8000 necessária para se obter potencial hídrico na solução nutritiva de -1,5 MPa. Neste momento também foi aplicado o tratamento de insuficiência de N às outras plantas. Na sequência realizara-se as retiradas de amostras e avaliações correspondentes.

Para obter informações relativas ao efeito do estresse hídrico e omissão do nitrogênio sobre a fotossíntese e os parâmetros relacionados com a fluorescência da clorofila *a*, utilizou-se as cultivares Catuaí Amarelo 62, Catuaí Vermelho IAC44,

Acauã, Catucaí Amarelo 2SL e Mundo Novo IAC379-19. Sendo que, este experimento foi montado em um esquema em fatorial 5 x 3, compostos de 5 cultivares de café (Catuaí Amarelo 62, Catuaí Vermelho IAC44, Acauã, Catucaí Amarelo e Mundo Novo IAC379-19) e três tratamentos (N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) sem estresse hídrico, N-suficiente (+N, 5,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) com déficit hídrico (-1,5 MPa) e N-deficiente (+N, 0,0 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻) no delineamento em blocos casualizados com três repetições onde cada parcela era constituída por duas plantas. Todas as medições de trocas gasosas e fluorescência foram feitas respeitando o delineamento em blocos casualizados.

Ao final do experimento, foram realizadas medições no sexto par de folhas completamente expandida para verificação do nível de potencial hídrico alcançado. As avaliações de parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila foram realizadas sétimo par de folhas completamente expandida

2.2. Potencial hídrico foliar

Foi utilizada uma bomba de pressão do tipo Scholander conforme descrito por DaMatta et al. (1997), e as medições realizadas às 05:00h (antemãhã). As determinações foram feitas em folhas individualizadas e completamente expandidas localizadas no sexto par de folhas do ramo ortotrópico contados a partir da base das plantas.

2.3. Trocas gasosas

Taxa de assimilação líquida de carbono (*A*), condutância estomática ao vapor de água (*g_s*), taxa transpiratória (*E*), razão interna e externa de carbono (razão *C_i/C_a*). Medidas por volta das 08h00 empregando um analisador de gases a infravermelho portátil (LICOR 6400, Li-COR, Lincoln, Nebraska, EUA) sob intensidade de fluxo fotônico de 1000 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. A eficiência do uso da água foi calculada pela razão *A/E*.

2.4. Variáveis de fluorescência

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram medidos nas mesmas folhas por meio de um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (PAM). Foram medidas primeiramente a fluorescência inicial (*F₀*), fluorescência máxima (*F_m*), fluorescência variável (*F_v* = *F_m* - *F₀*), e eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) (*F_v/F_m*), parâmetros estes determinados em condições de escuro.

Logo após foram determinadas as variáveis de fluorescência constante (F_s') e fluorescência máxima (F_m'), em condições luz. Folhas adaptadas ao escuro por 30 min foram iluminadas com pulsos de luz vermelha de baixa intensidade e frequência para obtenção da fluorescência inicial (F_0). Um pulso de luz saturante de pulso de $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado por um segundo para medir a emissão de fluorescência máxima (F_m). Com esses parâmetros foi estimado o rendimento quântico efetivo através do FSII por $\Phi_{\text{FSII}} = (F_m' - F_s')/F_m'$, conforme Genty et al., 1989. Foi estimada F_0 adaptada a luz $F_0' = F_0/(F_v/F_m + F_0/F_m')$. O coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) foi determinada pela equação onde $\text{NPQ} = (F_m/F_m') - 1$, segundo Krause e Weiss (1991). A fração de irradiância não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente foi determinada como $\text{PE} = (F_v'/F_m') * (1 - q_p)$, segundo Demming-Adams et al. (1996). A taxa de transporte de elétrons foi calculada segundo a fórmula $\text{ETR} = \Phi_{\text{FSII}} \times 0,5 \times \text{FFF} \times \text{AL}$, onde AL é a absorvância luminosa para *Coffea* sp. (Dias, 2006), e FFF é a intensidade de fluxo fotônico $1000 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e 0,5 a fração de energia distribuída para o PSII.

Todas as avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram feitas respeitando o delineamento em blocos casualizados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Potencial Hídrico Foliar

O potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) reduziu-se significativamente com a imposição do déficit hídrico de -1,5 MPa. Esse potencial hídrico imposto foi suficiente para causar efeitos nas cultivares escolhidas, como observado na redução de cinco vezes no potencial hídrico médio das cultivares (Tabela 1). Todavia, não foi constatada diferença entre as cultivares independentemente do déficit hídrico (Tabela 1).

A variável potencial hídrico foliar Ψ_{wf} é uma boa referência das condições hídricas da planta, particularmente durante períodos de seca e neste trabalho observa-se que a imposição do déficit hídrico causou redução do Ψ_{wf} das mudas de café indicando que a condição imposta afetou o conteúdo de água nas folhas (Tabela 1). Alguns trabalhos têm mostrado que plantas tolerantes à restrição hídrica possuem maior Ψ_{wf} em comparação àquelas menos tolerantes, devido à presença de mecanismos que podem postergar a desidratação celular (Jongdee et al., 2002).

Tabela 1. Potencial Hídrico Foliar na antemanhã de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) em condição de estresse hídrico (-1,5 MPa)

| Cultivares | Estresse hídrico | |
|-----------------|------------------|----------|
| | Controle | -1,5 MPa |
| Catuaí Vermelho | 0,24 | -1,12 * |
| Catuaí Amarelo | 0,38 | -1,27 * |
| Catuaí Amarelo | 0,33 | -1,32 * |
| Mundo Novo | 0,33 | -1,12 * |
| Acauã | 0,33 | -1,30 * |
| Média | 0,31 | -1,24 * |
| CV (%) | 21,23 | |

Médias seguidas por * se diferem na linha pelo teste *t* ($p \leq 0,05$).

3.2. Trocas Gasosas

O cafeeiro é tradicionalmente considerado como uma planta que apresenta valores de taxa fotossintética líquida (*A*) muito baixos geralmente entre 4 a 10 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, que podem variar conforme o tamanho do recipiente em que é cultivado em condições experimentais, (DaMatta, 2003; Pinheiro et al., 2004). Os valores de *A* para as plantas controles variou de 10,276 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ consumido m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a cultivar Acauã e a 5,680 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ consumido m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a cultivar Catuaí vermelho (Tabela 2). Esta diferença na taxa fotossintética encontrada entre as duas cultivares pode estar relacionada a uma menor condutância estomática exibida na cultivar Catuaí vermelho em relação a cultivar Acauã (Tabela 3). Sabe-se que em condições de déficit hídrico a fotossíntese pode ser direta ou indiretamente afetada por mecanismos estomáticos.

A variável *A* foi reduzida em plantas submetidas ao estresse hídrico e somente a cultivar Acauã apresentou redução de *A* na condição de deficiência de nitrogênio (Tabela 2). A taxa fotossintética líquida na condição sem déficit hídrico e N-suficiente, apresentou-se maior nas cultivares Mundo Novo e Acauã (Tabela 2).

Dentre as cultivares estudadas a cultivar Catuaí Vermelho exibiu a menor redução da *A* quando se aplicou o déficit hídrico, enquanto a cultivar Acauã apresentou a maior redução em *A* quando o déficit hídrico de -1,5 MPa ou a deficiência de N foram impostos, ou seja, esta foi a cultivar mais afetada pelo déficit hídrico e pela deficiência de N (Tabela 2).

A condutância estomática (g_s), mostrou-se reduzida em condições de déficit hídrico, e esta redução ocorreu em todas as cultivares, mas a deficiência de N não influenciou a g_s (Tabela 2). Entre as cultivares observa-se que a cultivar Acauã possui

maior g_s na condição controle (sem déficit hídrico e N-suficiente), sendo que em condições de N-deficiente, desta cultivar juntamente com Catuaí Vermelho possuíam maior g_s e as cultivares Catuaí Amarelo, Catucaí Amarelo e Acauã formam o grupo das cultivares com g_s inferior (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa Fotossintética Líquida (A) e Condutância Estomática (g_s) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) em condição de estresse hídrico (-1,5 MPa) e estresse nutricional (N-insuficiente)

| Cultivares | Estresse | | | | | |
|-----------------|--|----------|----------|---|----------|---------|
| | Controle | -1,5 MPa | N- | Controle | -1,5 MPa | N- |
| | A (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) | | | g_s (mmol m ⁻² s ⁻¹) | | |
| Catuaí Vermelho | 5,680 c | 3,096 a* | 5,671 b | 0,497 b | 0,393 a* | 0,530 a |
| Catuaí Amarelo | 6,330 c | 2,861 a* | 6,193 b | 0,497 b | 0,392 a* | 0,498 b |
| Catucaí Amarelo | 7,876 b | 3,416 a* | 6,573 b | 0,501 b | 0,393 a* | 0,497 b |
| Mundo Novo | 9,313 a | 3,533 a* | 8,461 a | 0,508 b | 0,392 a* | 0,513 b |
| Acauã | 10,576 a | 3,956 a* | 7,823 a* | 0,537 a | 0,381 a* | 0,537 a |
| Média | 7,955 | 3,372 * | 6,944 | 0,508 | 0,392 * | 0,515 |
| CV (%) | 14,31 | | | 2,47 | | |

Médias seguidas por * diferem na linha do tratamento Controle pelo teste t ($p \leq 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre se pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

As taxas transpiratórias (E) mostraram-se reduzidas em condições de déficit hídrico e não houve diferença nesta variável quando aplicou-se a deficiência de N, sendo esta redução percebida em todas as cultivares no tratamento com deficiência hídrica (Tabela 3). No tratamento controle (sem déficit hídrico e N-suficiente), tem-se as cultivares Mundo Novo e Acauã com alta taxa transpiratória e outro grupo formado pelas cultivares Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo e Catucaí Amarelo exibindo menor E (Tabela 3).

Em condições de déficit hídrico a cultivar Acauã, que exibiu a maior taxa fotossintética no tratamento controle, apresentou uma redução de 62,6 % em sua fotossíntese líquida e de 65 % em sua taxa transpiratória, e a cultivar Catuaí Vermelho, que apresentou a menor taxa fotossintética no tratamento controle apresentou uma redução de 45,5 % em sua fotossíntese líquida e de 33,5 % em sua taxa transpiratória (Tabela 3). Este declínio substancialmente maior apresentado pela cultivar Acauã em relação a cultivar Catuaí Vermelho pode estar relacionado a menores valores de condutância estomática desta cultivar em condições de déficit hídrico (Tabela 3).

A relação carbono interna da câmara subestomática e carbono atmosférico (C_i/C_a) em condições de controle (sem déficit hídrico e N-suficiente) apresenta-se

significativamente maior nas cultivares Mundo Novo e Acauã em relação às cultivares Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo com as menores relações C_i/C_a (Tabela 3), o que é verificado pelas maiores condutâncias estomáticas, das cultivares Mundo Novo e Acauã, em paralelo a equivalentes valores de taxa fotossintética das mesmas. Entretanto, todas as cultivares testadas neste estudo, mostraram uma manutenção da razão C_i/C_a sob condições de N-deficiente em relação as condição controle (Tabela 3).

De acordo com DaMatta et al (2002) a medida que se intensifica o estresse hídrico, pode ocorrer também uma inibição não-estomática da fotossíntese, determinada pelo comprometimento da regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato e também por um decréscimo na atividade de carboxilação dessa enzima.

Tabela 3. Taxa Transpiratória de cultivares (E) de cafeeiro e Relação carbono interna da câmara subestomática e carbono atmosférico (C_i/C_a) (*Coffea arabica*) em condição de estresse hídrico (-1,5 MPa) e estresse nutricional (N-insuficiente)

| Cultivares | Estresse | | | | | |
|-----------------|---|----------|--------|-----------------|----------|---------|
| | Controle | -1,5 MPa | N- | Controle | -1,5 MPa | N- |
| | E mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) | | | Razão C_i/C_a | | |
| Catuaí Vermelho | 1,437 b | 0,501 b* | 1,683 | 0,947 c | 0,798 a | 0,891 c |
| Catuaí Amarelo | 1,537 b | 0,523 b* | 1,533 | 1,221 c | 1,521 a | 1,197 c |
| Catuaí Amarelo | 1,650 b | 0,687 a* | 1,133 | 1,921 b | 1,003 a | 1,557 b |
| Mundo Novo | 2,191 a | 1,481 a* | 1,983 | 2,521 a | 1,517 a | 2,453 a |
| Acauã | 2,361 a | 1,571 a* | 2,056 | 2,831 a | 1,583 a | 2,617 a |
| Média | 1,8352 | 0,957* | 1,6776 | 1,888 | 1,284* | 1,743 |
| CV (%) | | 2,54 | | | 15,21 | |

Médias seguidas por * diferem na linha do tratamento Controle pelo teste t ($p \leq 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre se pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

A eficiência do uso da água (A/E) foi afetada em condições de déficit hídrico, e esta mudança ocorreu de forma distinta entre as cultivares (Tabela 4). Nas cultivares Mundo Novo e Acauã houve redução nesta variável, nas cultivares Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo houve aumento na eficiência do uso da água e na cultivar Mundo Novo não houve diferença nesta variável entre o tratamento controle e o tratamento com déficit de hídrico (Tabela 4). A deficiência de N não provocou mudanças na eficiência do uso da água em nenhuma das cultivares avaliadas neste estudo (Tabela 4).

As taxas transpiratórias menores nas cultivares Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo em relação às cultivares Mundo Novo e Acauã em condição de déficit hídrico refletem maior eficiência no uso da água para aquelas cultivares (Tabela 4).

Tabela 4. Eficiência no uso da água (*A/E*) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) em condição de estresse hídrico (-1,5 MPa) e estresse nutricional (N-insuficiente)

| Cultivares | Estresse | | |
|-----------------|----------|----------|---------|
| | Controle | -1,5 MPa | N- |
| Catuaí Vermelho | 3,95 a | 6,179 a* | 3,369 b |
| Catuaí Amarelo | 4,118 a | 5,470 a* | 4,039 b |
| Catuaí Amarelo | 4,773 a | 4,972 a | 5,801 a |
| Mundo Novo | 4,251 a | 2,380 b* | 4,266 b |
| Acauã | 4,479 a | 2,518 b* | 3,804 b |
| Média | 3,204 | 1,764 | 2,525 |
| CV (%) | 32,11 | | |

Médias seguidas por * diferem na linha do tratamento Controle pelo teste *t* ($p \leq 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

3.3. Variáveis da Fluorescência da Clorofila *a*

O déficit hídrico e a deficiência de N levaram à redução na taxa de transporte de elétrons (ETR) das cultivares avaliadas neste estudo (Tabela 5). Sendo que o déficit hídrico levou a uma queda média de 63,4 % na ETR e a deficiência de N causou uma redução média de 27,6 % nesta variável. No tratamento controle a cultivar Mundo Novo exibiu maior ETR e as demais cultivares, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Catuaí Amarelo e Acauã formaram um grupo com menor ETR (Tabela 5). Com a imposição do déficit hídrico, as cultivares Catuaí Vermelho, Mundo Novo e Acauã formaram o grupo com maior ETR, seguido pelas cultivares Catuaí Amarelo e Catuaí Amarelo que apresentaram menor ETR (Tabela 5). Não houve diferença entre as cultivares quando a deficiência de N foi imposta (Tabela 5).

A omissão de N levou a redução média de 58 % no rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ϕ FSII), que mede a quantidade de energia utilizada na fotossíntese (Tabela 5). Já a deficiência hídrica levou a uma redução média de 72 % no ϕ FSII (Tabela 5). No tratamento controle (sem déficit hídrico e N-suficiente) e no tratamento N-deficiente, os valores ϕ FSII apresentados pelas cultivares testadas não permitiram diferenciá-las, pois não houve diferença entre as mesmas ($p \geq 0,05$). Após a imposição do déficit hídrico, as cultivares Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Mundo Novo e Acauã foram agrupadas apresentando maior ϕ FSII e a cultivar Catuaí Amarelo exibiu um menor ϕ FSII (Tabela 5).

As quedas no ϕ FSII resultam na geração de menor quantidade de compostos redutores e, conseqüentemente, queda na ETR e, em conjunto, tais alterações podem explicar, em parte, as quedas em *A* (Tabela 2) quando o déficit hídrico foi imposto

(Damour et al., 2010; Warren, 2011). Já no tratamento N-deficiente, as reduções nas variáveis ϕ FSII e ETR não foram tão expressivas para afetar a A.

Apesar da grande associação do N (50-80 %) ao aparato fotossintético (Langsdorf et al., 2000). A manutenção da A, no tratamento com deficiência, pode ser atribuída a não alteração dos teores da rubisco, enzima que atua na fotossíntese e apresenta N em sua estrutura. Cerca de 90 % da rubisco é sintetizada em até duas semanas após a expansão foliar, como as avaliações desses parâmetros foram feitas no sétimo par de folhas completamente expandidas, e a planta já estava emitindo o nono par de folhas, e como déficit de N imposto foi de 96 h, certamente a fase de pico de síntese da rubisco não coincidiu com a época de omissão de N (Makino et al., 1992; Bungard et al., 1997). Dessa forma, a não alteração da A, no tratamento com déficit de N pode ser explicado pela não coincidência da fase de síntese da rubisco na folha e a época de aplicação do tratamento.

Tabela 5. Taxa de transporte de elétrons (ETR) e Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ϕ FSII) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) em condição de estresse hídrico (-1,5 MPa) e estresse nutricional (N-insuficiente)

| Cultivares | Estresse | | | Estresse | | |
|-----------------|----------|----------|-----------|-------------|----------|----------|
| | Controle | -1,5 MPa | N- | Controle | -1,5 MPa | N- |
| | ETR | | | ϕ FSII | | |
| Catuaí Vermelho | 16,850 b | 8,067 a* | 12,200 a* | 0,260 a | 0,074 a* | 0,105 a* |
| Catuaí Amarelo | 16,750 b | 3,350 b* | 12,658 a* | 0,259 a | 0,071 a* | 0,108 a* |
| Catuaí Amarelo | 18,267 b | 4,982 b* | 13,601 a* | 0,279 a | 0,054 b* | 0,107 a* |
| Mundo Novo | 21,550 a | 7,316 a* | 14,517 a* | 0,320 a | 0,091 a* | 0,128 a* |
| Acauã | 16,267 b | 9,117 a* | 11,952 a* | 0,204 a | 0,094 a* | 0,105 a* |
| Média | 17,937 | 6,567* | 12,985* | 0,265 | 0,077 * | 0,111 * |
| CV (%) | 14,4 | | | 6,5 | | |

Médias seguidas por * se diferem na linha do tratamento Controle pelo teste *t* ($p \leq 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes na coluna se diferem entre si pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

Para a variável eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), em todas as cultivares avaliadas nesse estudo houve redução desta variável, com os dois tratamentos aplicados, comparativamente ao controle (Tabela 6). O valor de 0,75, para esta variável, é considerado referencial para exibir limitação. Nos dois tratamentos e em todas as cultivares estudadas, o valor apresentado, para F_v/F_m , foi inferior a 0,75 indicando perda da capacidade fotossintética (Bolhar-Nordenkamp et al., 1989).

No tratamento N-deficiente, a redução na eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, não foi limitante às reações fotossintéticas, pois a omissão de N e queda da F_v/F_m não resultou em menores A (Tabela 2), desta forma, a F_v/F_m não foi uma

variável sensível ao estresse. O contrário pode ser afirmado para o tratamento com déficit de hídrico, pois a redução da F_v/F_m foi limitante para as reações fotossintéticas (Tabela 2), indicando assim, que esta variável foi sensível ao estresse hídrico.

Tabela 6. Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) em condição de estresse hídrico (-1,5 MPa) e estresse nutricional (N-insuficiente)

| Cultivares | Estresse | | |
|-----------------|----------|----------|----------|
| | Controle | -1,5 MPa | N- |
| Catuaí Vermelho | 0,891 a | 0,571 a* | 0,683 a* |
| Catuaí Amarelo | 0,901 a | 0,561 a* | 0,681 a* |
| Catuaí Amarelo | 0,893 a | 0,563 a* | 0,701 a* |
| Mundo Novo | 0,902 a | 0,633 a* | 0,692 a* |
| Acauã | 0,801 a | 0,723 a* | 0,632 a* |
| Média | 0,877 a | 0,610* | 0,678* |
| CV (%) | 8,21 | | |

Médias seguidas por * diferem na linha do tratamento Controle pelo teste t ($p \leq 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre se pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5 % de probabilidade.

4. CONCLUSÕES

De maneira geral, o déficit de N de curto prazo causou menores danos ao aparelho fotossintético das plantas que o déficit hídrico.

CONCLUSÕES GERAIS

Considerando as variações observadas na cinética de absorção, a cultivar Catuaí Amarelo apresentou melhor adaptação às condições de estresse hídrico moderado.

De maneira geral, a expressão relativa dos genes estudados foi maior na cultivar Mundo Novo comparativamente a cultivar Catuaí Amarelo, em condições de déficit hídrico e deficiência de N por curto prazo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C, Truong HN Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 28: 500–512, 2005
- Ashraf M, Shabaz M, Ashraf MY. Influence of nitrogen supply and water stress on growth and nitrogen, phosphorus, potassium and calcium contents in pearl millet. *Biol. Plant.* 44, 459–462, 2001
- Bolhar-Nordenkampf HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber ULEG, Lechner EG. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct. Ecol.*, 4:497-514, 1989
- Borghi B. Nitrogen as determinant of wheat growth and yield. In: Satorre, E.H., Slafer, G.A. (Eds.), *Wheat Ecology and Physiology of Yield Determination*. Food Products Press, New York, NY, pp. 67–84, 2000
- Bungar DRA, Mcneil D, Morton, JD. Effects of nitrogen on the photosynthetic apparatus of *Clematis vitalba* grown at several irradiances. *Aust. J. Plant Physiol.* 24:205-214. 1997
- Crawford NM, Forde BG Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The Arabidopsis Book* 1: e0011, doi/10.1199/tab.0011, 2002
- DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME Limitations to photosynthesis in *Coffea Canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*, 159: 975-981, 2002
- DaMatta FM, Maestri M, Barros RS Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica*, 34: 257-264, 1997
- Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant Cell Env.*, 33:1419-1438, 2010
- Demming-Adams B, Adams WW, Baker DH, Logan BA, Bowling DR, Verhoeven AS Using chlorophyll fluorescence to access the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98: 253-264, 1996
- Dias PC. Variação espacial da fotossíntese e de mecanismos de fotoproteção no cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Viçosa, UFV (Tese de Mestrado), 34 pp, 2006
- Evans JR Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia*, 78: 9–19, 1989
- Genty B, Briantais JM, Baker NR The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochemical Biophysics Acta*, 990, 87-92, 1989
- Heitholt JJ. Water use efficiency and dry matter distribution in nitrogen- and water-stressed winter wheat. *Agron. J.* 81, 464–469, 1989

- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 138: 1184–1194, 2009
- Jongdee B, Fukai S, Cooper M. Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. *Field Crops Res.*, 76:153–163, 2002
- Krause GH, Weiss E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basis. *Annual review of Plant Physiology in Plant Molecular Biology*, 42: 313–249, 1991
- Langsdorf G, Buschmann M, Sowinska M, Banbani F, Mokry F, Timmermann F, Lichtenthaler HK. Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *Photosynth.*, 38:539–551, 2000
- Lu C & Zhang J. Photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. *Plant Sci*, 151: 135–143, 2000
- Makino A, Sakashita H, Hidema JMAE, Ojima K, Osmond B. Distinctive responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and carbonic anhydrase in wheat leaves to nitrogen nutrition and their possible relationships to CO₂ transfer resistance. *Plant Physiol.*, 100:1737–1743, 1992
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, 167: 1307–1314, 2004
- Shangguan Z, Shao M, Dyckmans J. Nitrogen nutrition and water stress effects on leaf photosynthetic gas exchange and water use efficiency in winter wheat. *Environ. Exp. Bot.* 44, 141–149, 2000
- Terashima I, Evans JR Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant Cell Physiol*, 29: 143–155, 1988
- Villela FA, Beckert OP Potencial osmótico de soluções aquosas de polietileno 482 glicol 8000. *Rev Bras Sementes*, 23:267–275, 2001
- Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, Engels C Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *J Exp Bot*, 51: 227–237, 2000
- Warren, CR. How does P affect photosynthesis and metabolite profiles of *Eucalyptus globulus*? *Tree Phys*, 7:727–739, 2011
- Wu FZ, Bao WK, Li FL, Wu N. Effects of drought stress and N supply on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of *Sophora davidii* seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 63, 248–255, 2008
- Zhang H & Forde BG. Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J Exp Bot*, 51: 51–59, 2000