

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MATHEUS DA COSTA QUEIROZ

**MARCADORES ANATÔMICOS PARA SELEÇÃO DE CULTIVARES DE
CAFEIRO TOLERANTES AO DÉFICIT HÍDRICO**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

MATHEUS DA COSTA QUEIROZ

**MARCADORES ANATÔMICOS PARA SELEÇÃO DE CULTIVARES DE
CAFEIRO TOLERANTES AO DÉFICIT HÍDRICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa como parte das
exigências para a obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.

Orientador: Edgard Augusto de Toledo Picoli

Coorientadores: Genaina Aparecida de Souza
Ulisses José Figueiredo

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

MATHEUS DA COSTA QUEIROZ

**MARCADORES ANATÔMICOS PARA SELEÇÃO DE CULTIVARES DE
CAFEIRO TOLERANTES AO DÉFICIT HÍDRICO**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa como parte das
exigências para a obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.**

APROVADO: 06 de dezembro de 2017.

Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli
(orientador)
(UFV)

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(UFV)

AGRADECIMENTOS

"Aliás, sabemos que todas as coisas concorrem para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são os eleitos, segundo os seus desígnios". (*Romanos 8, 28*)

A Deus e a Maria, que me trouxeram até aqui e ainda me levarão muito além.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal, a EPAMIG e ao Laboratório de Anatomia Vegetal pela infraestrutura disponível e oportunidades de crescimento profissional.

Aos meus pais que com todos os seus ensinamentos me moldaram a pessoa que sou hoje. Amo vocês.

À minha irmã Letícia e ao meu irmão de consideração Luís, que souberam me apoiar e corrigir quando necessário.

Ao professor Edgard, pela confiança depositada e por todas valiosas orientações.

À Genaina Souza, por toda generosidade de ensinar e me acompanhar desde o início na construção deste trabalho. Obrigado pela dedicação e amizade estabelecida.

À professora Marília, pela disponibilidade e generosidade ao ensinar, e por contribuir para meu crescimento ao longo desses três anos de trabalho juntos.

Aos meus amigos de laboratório, Antônio Augusto, Bruno Tavares, Leonardo Araujo e Ramon Badaró, que se tornaram amigos de vida, sem vocês esse trabalho não seria concluído. Obrigado pessoal!

À Antônio Alves Pereira, o Tônico, pela disponibilidade e oportunidade concedida, e ao Antonio Carlos Baiao de Oliveira pela disposição em ajudar.

Aos meus amigos de república, João Eduardo e Willian, por todos esses oito anos de convivência sadia e sólida.

Aos meus demais amigos que souberam me apoiar e respeitar a minha ausência.

À minha querida namorada Ana Clara, que soube cuidar e amar de forma tão intensa que fez com que esse período não fosse tão difícil. Te amo.

Aos meus familiares que mesmo distantes, me apoiaram em todas as minhas escolhas, muito obrigado.

À todas as pessoas que contribuíram com sua torcida e orações para que eu realizasse este sonho.

À Fapemig pela concessão da bolsa de iniciação científica.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

RESUMO

O cafeeiro é uma espécie originária de ambientes sombreados, porém no nosso país é cultivado a pleno sol. Atualmente mudanças no padrão de chuvas vem causando perdas devido a limitação hídrica. Na busca de características que podem ser utilizadas em programas de melhoramento genético com intuito de conferir tolerância a limitação hídrica estudamos as características anatômicas do limbo e do pecíolo de cultivares de café. O material vegetal foi obtido em plantio experimental na unidade da Epamig de Patrocínio, MG. Foram coletadas cinco plantas por cultivar, 20 folhas por planta. Essas folhas foram fixadas em FAA para transporte até o local de processamento. As regiões centrais de dez folhas saudáveis foram seccionadas. Foram avaliados os tecidos do limbo foliar, estômatos e venação das folhas, tecido vascular e de composição do pecíolo. As análises foram realizadas para todos os caracteres com a estimação dos componentes de variância e a predição dos efeitos aleatórios utilizando-se a abordagem de modelos mistos, pelo método da máxima verossimilhança restrita/melhor predição linear não tendenciosa. Encontramos diferença significativa para a maioria das características avaliadas, principalmente quanto a espessura do limbo foliar, parênquima paliçádico e lacunoso. A avaliação dessas variáveis apresentou herdabilidade e acurácia consideradas altas. Portanto, as características avaliadas podem ser utilizadas como ferramenta em programas de melhoramento genético visando seleção precoce de genótipos tolerantes ao déficit hídrico.

A herdabilidade e acurácia das análises conferem credibilidade a inclusão de 20 variáveis como possíveis marcadores para seleção precoce de cafeeiros tolerantes ao déficit hídrico.

Palavras-chave: café, anatomia vegetal, déficit hídrico, melhoramento genético.

ABSTRACT

Coffee is native to shady environments, but in our country it is cultivated in full sun. Currently changes in the rainfall pattern have been causing losses due to water limitation. Searching traits that can be used in breeding programs with the aim of conferring tolerance to water limitation, we studied the anatomical characteristics of the limb and the petiole of coffee cultivars. The plant material was obtained from an experimental planting at the Epamig in Patrocínio, MG. Five plants per cultivar were collected, 20 leaves per plant. These leaves were fixed in FAA for transport to the processing site. The central regions of ten healthy leaves were trimmed. The tissues of leaf limb, stomata and venation of leaves, vascular tissue and petiole composition were evaluated. The analyzes were performed for all the characters with the estimation of variance components and the prediction of the random effects using the mixed models approach, by the method of the maximum likelihood restricted/best unbiased linear prediction. We found a significant difference for most of the evaluated characteristics, mainly in comparison with the thickness of leaf limb, palisade parenchyma and lacunosis. The evaluation of these variables showed high heritability and accuracy. Therefore, the evaluated characteristics can be used as a tool in breeding programs for the early selection of genotypes tolerant to water deficit. The heritability and accuracy of the analyzes lends credibility to the inclusion of 20 variables as possible markers for the early selection of coffee trees tolerant to water deficit.

Keywords: coffee, plant anatomy, crop breeding, water deficit.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Obtenção do material vegetal.....	9
2.2. Espessura da folha e seus componentes, parênquima paliçádico e lacunoso:	11
2.3. Análises estatísticas	11
3. RESULTADOS	12
3.1. Estimativa de parâmetros genéticos para prospecção de marcadores anatômicos em cultivares de café com tolerância observada em campo para déficit hídrico.....	12
3.2. Índice de seleção baseado na média de classificações para classificação de cultivares de café como tolerantes ou suscetíveis	15
4. DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO	24
6. AGRADECIMENTOS	24
7. MATERIAL SUPLEMENTAR	24
8. REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro é uma espécie originária de ambientes sombreados da Etiópia, que é um dos produtos agrícolas mais negociados do mundo atual, sendo cultivado em cerca de 80 países. O gênero *Coffea* compreende mais de 100 espécies, dentre as quais *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner são responsáveis por, aproximadamente, 99% da produção mundial em grão (DAMATTA & RAMALHO, 2006), enquanto *C. liberica* Hiern responde por cerca de 1% da produção. Estudos anatômicos vêm sendo explorado atualmente (CAVATTE et al., 2012, MARTINS et al., 2014), principalmente buscando caracteres que contribuem para a tolerância a seca. A identificação dessas características com potencial uso no melhoramento e na seleção de cultivares é de extrema importância para seleção de material tolerante. Isso, devido ao progressivo aumento de temperatura e mudanças no padrão de precipitação em regiões produtoras de café figura como grande esperança para adaptação dessa cultura (NARDINI et al., 2014), principalmente em cenários futuros.

Entretanto, pouco ainda se sabe, em termos de características hidráulicas entre diferentes espécies ou genótipos de café, e suas relações com a possível tolerância à seca. Estudos recentes têm apontado que características do limbo foliar e do pecíolo são determinantes para a adaptabilidade das plantas à limitação hídrica e a limitação do potencial fotossintético em café (MARTINS et al., 2014, NARDINI et al., 2014). Resultados relatados por Martins et al. (2014) sugerem que a arquitetura hidráulica das folhas de café impõe forte resistência ao fluxo de água que, por sua vez, deve limitar a difusão de CO₂ na folha (BRODRIBB, 2009) e, conseqüentemente, limitar a maximização das taxas fotossintéticas.

As folhas apresentam grande diversidade em tamanho, estrutura e função. O padrão de venação é extremamente variável entre as espécies, e, nas angiospermas, apresentam um conjunto mais diversificado de sistemas de venação (SACK & SCOFFONI 2013). Grande parte dessa diversidade está ligada a adaptação do sistema hidráulico, pois a folha é um componente chave deste sistema na planta, que desempenha um papel importante na taxa máxima de trocas gasosas e crescimento (BRODRIBB et al. 2007, BRODRIBB et al. 2016).

A eficiência do transporte de água nas folhas se relaciona à distância que a água percorre fora do xilema à medida que se move para os locais de evaporação perto dos estômatos (SACK & HOLBROOK 2006). Esta distância é determinada pela densidade

de ramificação da rede de venação (BOYCE et al., 2009). Se relaciona também a proximidade dos estômatos e sua distribuição. Do tamanho e espaçamento dos poros estomáticos, que otimizam o uso da área epidérmica (DE BOER et al., 2016).

A construção de folhas que sustentam uma relação conservadora entre a densidade de venação (comprimento total da venação por unidade de área) e a densidade estomática (estômatos totais por unidade de área), e seus tecidos componentes, como o parênquima paliçádico e lacunoso, garantem um equilíbrio entre a taxa de abastecimento de água em superfícies evaporativas próximas aos estômatos e a demanda transpiracional (DE BOER et al., 2016).

Isso significa que os estômatos devem receber uma quantidade mínima de água para permitir que eles se abram de forma ideal (COWAN & FARQUHAR 1977, MEDLYB et al., 2011). Sob condições ideais de fornecimento de água, o investimento em tecido vascular não excede o mínimo exigido para a condutância estomática ideal. Esta visão é suportada por observações de que as densidades de tecido vascular e estomáticas são proporcionais dentro de plantas individuais, dentro de espécies, entre populações da mesma espécie e entre espécies em uma ampla gama de angiospermas (BRODRIBB et al., 2013, MARTINS et al., 2014, YANG et al., 2014, ZHANG et al., 2014, FIORIN et al., 2016)

Em relação à folha, a capacidade hidráulica do pecíolo deve ser coordenada com a lâmina foliar (SACK et al. 2003). Em videira, uma comparação entre os pecíolos, caules jovens e raízes, os pecíolos foram altamente suscetíveis à embolia (HOCHBERG 2015). Sendo assim, todos os componentes da folha, seus tecidos, estômatos e pecíolos devem ser avaliados, e o objetivo do trabalho foi estudar possíveis marcadores anatômicos para serem inseridos em um programa de melhoramento genético visando maior adaptabilidade ao déficit hídrico em café.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi obtido em plantio experimental na unidade da Epamig de Patrocínio, MG. Foram coletadas cinco plantas por cultivar, 20 folhas por planta (dez de cada lado), do terço médio da planta, sendo essas do terceiro ou quarto par do ramo

plagiotrópico, consideradas totalmente expandidas. Essas folhas foram imediatamente fixadas em FAA por 48 horas, posteriormente estocadas em álcool 70%, e transportadas para o local de processamento. A região central de dez folhas saudáveis (cinco de cada lado da planta), foram seccionadas e mantidas em álcool 70%.

Os genótipos utilizados consistiram de cultivares já lançados pela Epamig, ou ainda em fase de testes (Tabela 1).

De acordo com dados históricos da EPAMIG, sobre o comportamento em campo das cultivares, durante o período de seca e após a retomada das chuvas, os pesquisadores responsáveis pelas análises, classificaram as cultivares em grupos de Tolerantes, Não Tolerantes e Indeterminadas.

Tabela 1. Antecedentes das cultivares de *Coffea arabica* e classificação de tolerância ao déficit hídrico (dados empíricos fornecidos pela EPAMIG)

Classificação de tolerância	Cultivar
Indeterminada	Araponga MG1
Tolerante	Catiguá MG1
Tolerante	Catiguá MG2
Tolerante	MG5 Catiguá 3
Não tolerante	Oeiras MG6851
Indeterminada	Paraíso MG H419-1
Indeterminada	MG5 Paraíso 2
Indeterminada	Sacramento MG1
Não tolerante	Sarchimor MG8840
Indeterminada	MG5 Aranãs
Tolerante	Pau Brasil MG1
Não tolerante	Topázio MG1190
Não tolerante	Rubi MG1190
Indeterminada	MG5 Aranãs 2
Não tolerante	Catuaí Vermelho IAC144
Não tolerante	Mundo Novo IAC379-19
Não tolerante	Bourbon Amarelo MG0009
Indeterminada	Paraíso 3
Indeterminada	Paraíso 4
Tolerante	Pau Brasil 2

2.2. Espessura da folha e seus componentes, parênquima paliçádico e lacunoso:

Após a fixação em FAA 50% as amostras foram estocadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Em seguida, o material vegetal foi incluído em metacrilato (Historesin-Leica), segundo as recomendações do fabricante e seccionado transversalmente em micrótopo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica microsystems Inc., Deerfield, USA) com 5 µm de espessura e corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964).

Para o estudo da densidade de venação e de características estomáticas, as folhas foram clarificadas por meio da técnica de diafanização, descrita por Strittmatter (1973) e modificada para a espécie, considerando as seguintes etapas: ebulição durante 5 min em álcool etílico absoluto; ebulição durante 5 min em solução de álcool etílico absoluto + hidróxido de sódio 5% (1:1); lavagem em água corrente por 20 seg; enxague em água destilada por duas vezes por 3 min; clarificação com solução aquosa de hipoclorito de sódio durante 10 a 15 min, seguida de cinco lavagens em água destilada por 3 min; desidratação em etanol 70% por 10 min; coloração em solução hidroalcolica de safranina 1% por 30 min; imersão em etanol 80, 70 e 50% por 5 min; imersão em água destilada e montagem da lâmina em gelatina glicerinada.

Foram fotografados 10 campos distintos de cada amostra em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision, tendo sido digitalizadas e armazenadas.

Nestas imagens foram efetuadas medições nos 10 campos distintos de cada amostra por meio do software Image-Pro[®] Plus (version 4.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA). Avaliamos a espessura da lâmina foliar, parênquima paliçádico e lacunoso, epiderme nas faces abaxial e adaxial.

2.3. Análises estatísticas

As análises foram realizadas para todos os caracteres com a estimação dos componentes de variância e a predição dos efeitos aleatórios utilizando-se a abordagem de modelos mistos, pelo método da máxima verossimilhança restrita/melhor predição

linear não tendenciosa (REML/BLUP) (RESENDE, 2007a). Para isto, foi utilizado o seguinte modelo estatístico:

$$y = Xr + Zg + e$$

em que:

y : vetor de dados;

r : vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral;

g : vetor dos efeitos genotípicos de cultivares (aleatórios), sendo $g \sim \text{NMV}(0, I\sigma_g^2)$. O σ_g^2 é a variância associada aos efeitos genotípicos de cultivares;

e : vetor de erros aleatórios, sendo $e \sim \text{NMV}(0, I\sigma_e^2)$. O σ_e^2 é a variância associada aos efeitos residuais;

X e Z : matrizes de incidência para r e g , respectivamente.

A herdabilidade na média de cultivares (h_m^2) e a acurácia foram estimadas, e a significância dos efeitos aleatórios como a variância genotípica entre cultivares (σ_c^2) foram testadas pelo teste de razão da verossimilhança (*Likelihood Ratio Tests* - LRT) onde se obteve as análises de deviance para cada caráter avaliado (RESENDE, 2007a).

Essas análises estatísticas foram realizadas usando-se o software SELEGEN-REML/BLUP (RESENDE, 2007b).

3. RESULTADOS

3.1. Estimativa de parâmetros genéticos para prospecção de marcadores anatômicos em cultivares de café com tolerância observada em campo para déficit hídrico

Considerando as características avaliadas, a variância genotípica foi altamente significativa para os caracteres relacionados ao limbo foliar, espessura do limbo foliar (ELF), espessura do parênquima paliçádico (EPP), espessura do parênquima lacunoso (EPL), área de feixes do pecíolo em seção transversal (AFPST), área de xilema do pecíolo em seção transversal (AXPST), área de tecido vascular da folha em seção transversal (ATVFST), diâmetro médio dos elementos de vaso da folha (DMEVF), diâmetro equatorial dos estômatos (DEE), densidade de estômatos (DNE) e densidade de venação (DNV), das cultivares de café, de acordo com o LRT ($P \leq 0,01$) (Tab. 2 e 3), caracterizando esses caracteres como bons candidatos para serem inseridos em um

programa de melhoramento genético. A precisão experimental foi satisfatória com valores de acurácia (Acgen) acima de 80% demonstrando a confiabilidade dos dados (Tab. 2 e 3). Em média, a herdabilidade (h_m^2) das características também foi alta, com valores acima de 70%, evidenciando a possibilidade de seleção para estes caracteres.

As variáveis, área média dos elementos de vaso da folha (AMEVF) e diâmetro médio dos elementos de vaso da folha (DMEVF) mostraram herdabilidade e acurácia consideradas boas, acima de 65 % e 81%, respectivamente, enquanto a espessura da epiderme superior (EES) e espessura da epiderme inferior (EEI) apresentaram menores valores de herdabilidade e acurácia (Tab. S1).

Tabela 2. Avaliação de 20 cultivares de *Coffea arabica* desenvolvidas pela Epamig. Estimativas de parâmetros genéticos relacionados ao limbo foliar: espessura do limbo foliar (ELF), espessura do parênquima paliçádico (EPP), espessura do parênquima lacunoso (EPL), área do floema da folha em seção transversal (AFFST), área do xilema da folha em seção transversal (AXFST).

Parâmetros:	ELF	EPP	EPL	AFFST	AXFST
VG (δ^2g)	647,8385	24,37148	492,1956	0,001243	0,000708
LRT	46,06	13,61	47,33	53,76	27,79
h_{mc}^2 (%)	88,15	70,13	88,55	89,94	81,41
AC_{gen} (5)	93,39	83,74	94,1	94,83	90,22
Média Geral	286,9261	65,64272	176,5657	0,142685	0,172638
BLUP mínimo	249,3362	57,0185	131,1969	0,0804	0,1051
BLUP máximo	333,2208	73,7497	218,497	0,2005	0,2124

Tabela 3. Avaliação de 20 cultivares de *Coffea arabica* desenvolvidas pela Epamig. Estimativas de parâmetros genéticos relacionados ao limbo foliar: área de tecido vascular da folha em seção transversal (ATVFST), diâmetro médio dos elementos de vaso do xilema da folha (DMEVF), diâmetro equatorial dos estômatos (DEE), densidade de estômatos (DNE) e densidade de venação da folha (DNV).

Parâmetros:	ATVFST	DMEVF	DEE	DNE	DNV
VG (δ^2g)	0,003335	0,000001	1,531272	320,5559	0,286745
LRT	46,49	15,84	43,02	79,05	30,2
h_{mc}^2 (%)	88,26	72,63	87,32	93,75	82,6
AC_{gen} (%)	93,95	85,22	93,44	96,83	90,89
Média Geral	0,315322	0,004318	19,24428	145,0823	7,165138
BLUP mínimo	0,181	0,0035	17,2868	110,2019	6,5759
BLUP máximo	0,4152	0,0067	22,5906	186,2475	8,113

Podemos observar a diferença entre os componentes do limbo foliar (Fig. 1 A, B e C), a nervura central das folhas (Fig. 1 D, E e F) e para padrão de venação (Fig. 1 L, K

e L) dos cultivares avaliados. Para todas as características observamos maiores valores das características avaliadas para as cultivares consideradas tolerantes. Enquanto que para a distribuição estomática a diferenciação visual não é possível (Fig. 1G, H e I).

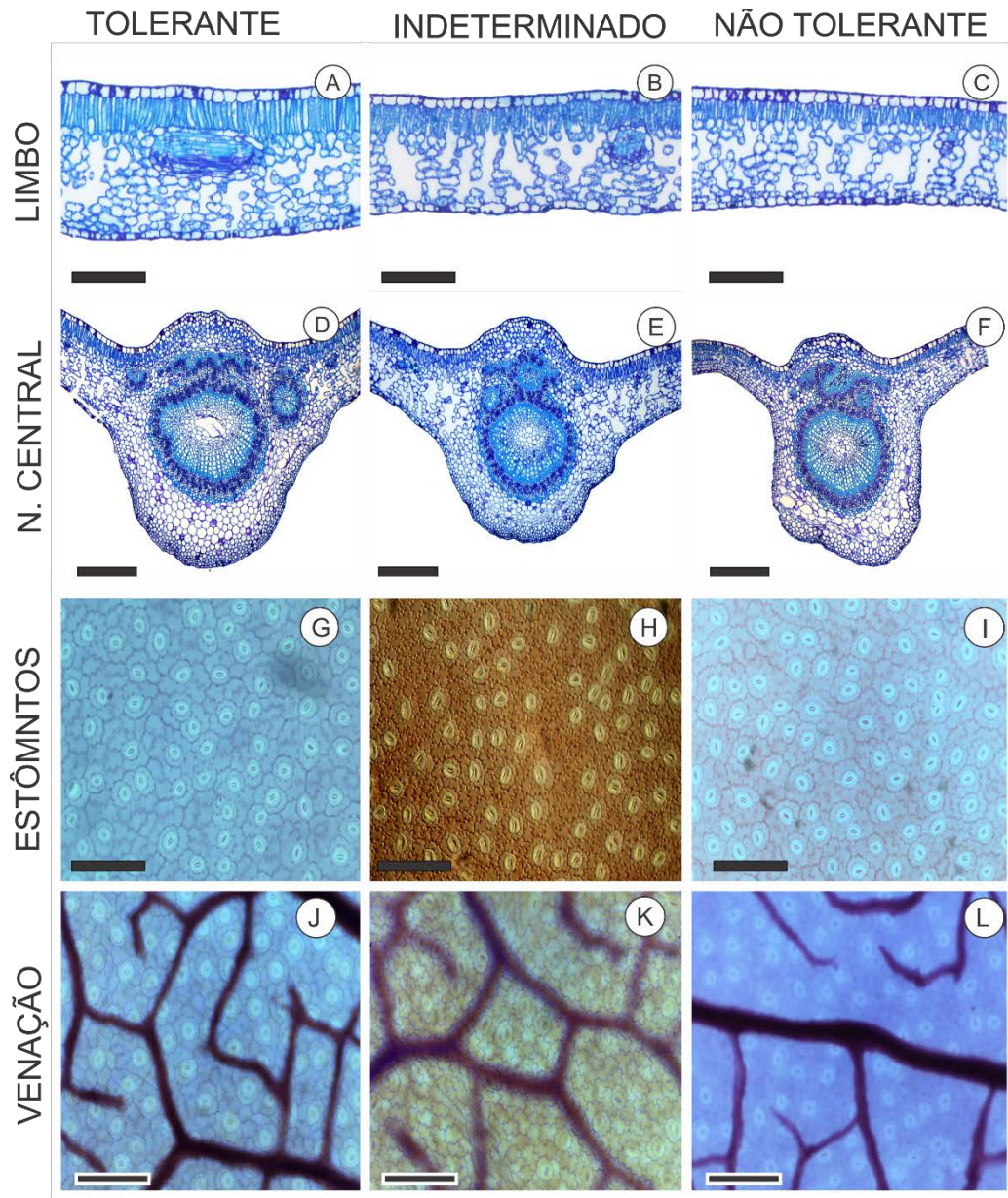


Figura 1: Fotomicrografias de folhas de *Coffea arabica*, ilustrando o comportamento da folha de cultivares com diferentes classificações de tolerância ao déficit hídrico. Barras = 200 μ m.

Com relação às características anatômicas dos pecíolos, para as variáveis AXPST, AFPST, ATPST, DMEVP, APP, ASTP e AMEVP foi observado efeito significativo ($P \leq 0,01$) (Tab. 4), no qual os cultivares apresentaram variabilidade genética entre si. Com menor relevância para o DNEVP (Tab. S2). A acurácia ficou

acima de 90,0 % para todos os caracteres (Tab. 3), caracterizando a alta precisão experimental, com herdabilidades acima de 84,0 %.

Tabela 4. Avaliação de 20 cultivares de *Coffea arabica* desenvolvidas pela Epamig. Estimativas de parâmetros genéticos relacionados ao pecíolo da folha. Área de xilema do pecíolo em seção transversal (AXPST), área de floema do pecíolo em seção transversal (AFPST), área de tecido vascular do pecíolo em seção transversal (ATVPST), diâmetro médio dos elementos de vaso do xilema do pecíolo (DMEVP), área do parênquima do pecíolo (APP), área do pecíolo em seção transversal (APST) e a área média dos elementos de vaso do pecíolo (AMEVP).

Parâmetros:	AXPST	AFPST	ATVPST	DMEVP	APP	APST	AMEVP
VG (δ^2g)	0,001875	0,002131	0,007761	0	0,366722	0,455887	0
LRT	39,62	64,49	68,71	35,42	33,62	38,17	35,17
h^2_{mc} (%)	86,28	91,86	92,45	84,81	84,1	85,79	84,71
AC_{gen} (%)	92,89	95,84	96,62	92,1	991,71	92,63	92
Média Geral	0,218985	0,235562	0,454546	0,004127	4,68363	5,138176	0,00017
BLUP mínimo	0,1488	0,1453	0,2885	0,0038	3,9922	4,3982	0,0001
BLUP máximo	0,3065	0,3185	0,6319	0,0045	5,9301	6,5742	0,0002

Enquanto que para as variáveis avaliadas no limbo foliar, apresentaram diferença visual possível de ser detectada, para o pecíolo nós percebemos apenas uma diferença na seção transversal para as cultivares classificadas como tolerantes (Fig. 2 A).

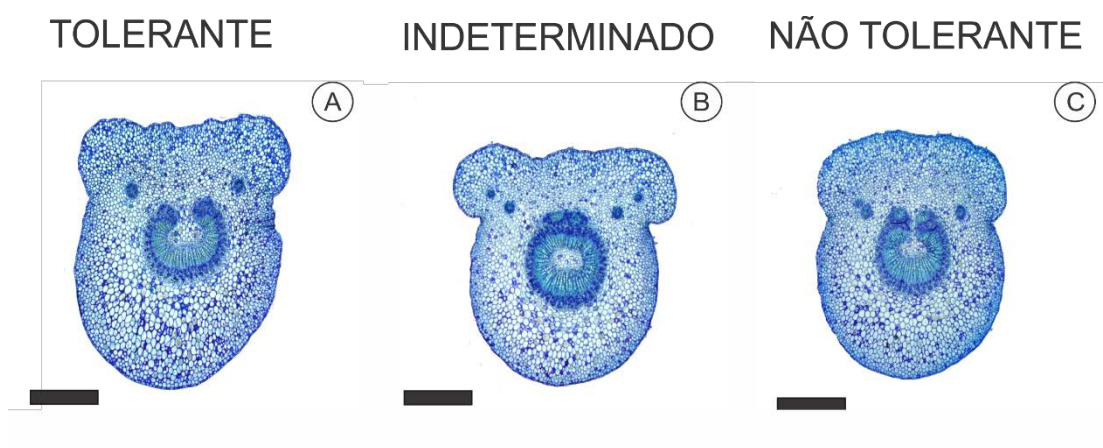


Figura 2: Fotomicrografias de pecíolos de *Coffea arabica*, ilustrando o comportamento do limbo foliar de cultivares com diferentes classificações de tolerância ao déficit hídrico. Barras = 100 μ m.

3.2. Índice de seleção baseado na média de classificações para classificação de cultivares de café como tolerantes ou suscetíveis

As características que provavelmente se associam a tolerância hídrica se mostraram com maiores valores nas cultivares descritas como tolerantes, ou algumas com tolerância desconhecida (Tab. 4 e 5). As cultivares que foram classificadas como não tolerantes, apresentaram as menores médias para essas características (Tab. 4 e 5).

As primeiras posições no ranking em relação às variáveis do limbo foliar foram ocupadas por variedades tolerantes (Tab. 5 e 6) de acordo com a classificação feita pelo histórico de ocorrência de danos causados pelo estresse hídrico no campo, o que confirma a eficiência da metodologia usada e na seleção com base nessas características. Estas características são fáceis de serem obtidas, a metodologia de processamento voltada para o cafeeiro já foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa em cafeeiro, orientado pelo Professor Edgard, o custo é acessível, e sua utilização pode aumentar a eficiência do programa de melhoramento de café.

Tabela 5. Rank das variáveis relacionadas ao limbo foliar das cultivares de *Coffea arabica*. Espessura do limbo foliar (ELF), espessura do parênquima paliçádico (EPP), espessura do parênquima lacunoso (EPL), área do floema da folha em seção transversal (AFFST), área do xilema da folha em seção transversal (AXFST), área de tecido vascular da folha em seção transversal (ATVFST), diâmetro médio dos elementos de vasos do xilema da folha (DMEVF), diâmetro equatorial dos estômatos (DEE), densidade de estômatos (DNE) e densidade de venação da folha (DNV).

Cultivares		ELF	EPP	EPL	AFFST	AXFST	ATVFST	DMEVF	DEE	DNE	DNV	Rank Médio
		Rank	Rank	Rank	Rank	Rank	Rank	Rank	Rank	Rank	Rank	
Pau Brasil 2	T	1	4	1	1	3	9	4	6	3	4	3,6
MG5 Catiguá 3	T	3	5	3	4	5	4	3	3	7	7	4,4
Catiguá MG2	T	4	2	6	6	6	5	2	4	4	9	4,8
Pau Brasil MG1	T	6	8	4	3	2	2	6	7	8	13	5,9
Catiguá MG1	T	5	6	5	10	8	8	7	1	6	8	6,4
Paraíso 3	IN	2	1	2	2	4	3	8	5	9	3	3,9
Araponga MG1	IN	8	7	8	9	9	7	1	2	1	2	5,4
MG5 Paraíso 2	IN	9	10	9	7	1	13	10	8	18	1	8,6
Sacramento MG1	IN	7	11	10	8	19	16	9	7	7	12	10,6
MG5 Aranãs	IN	11	9	12	11	13	17	5	18	12	5	11,3
Paraíso 4	IN	16	18	17	5	12	6	16	9	17	6	12,2
MG5 Araponga 2	IN	17	3	18	18	14	14	17	10	5	17	13,3
Paraíso MG H419-1	IN	19	19	15	15	20	20	13	13	11	19	16,4
B. Amarelo MG0009	NT	12	12	7	13	16	15	19	11	2	15	12,2
Oeiras MG6851	NT	10	14	13	20	10	11	11	12	10	16	12,7
Topázio MG1190	NT	15	13	16	12	11	10	12	19	15	18	14,1
C. Vermelho IAC144	NT	20	16	20	16	15	1	14	14	13	14	14,3
Rubi MG1192	NT	18	20	19	14	7	12	18	17	14	11	15
Sarchimor MG8840	NT	14	17	11	17	17	18	15	15	19	20	16,3
M. Novo IAC379-19	NT	13	15	14	19	18	19	20	20	20	10	16,8

Tabela 6. Rank das variáveis relacionadas ao pecíolo das cultivares de *Coffea arabica*. Área do xilema de pecíolo em seção transversal (AXPST), área do floema de pecíolo em seção transversal (AFPST), área de tecido vascular do pecíolo em seção transversal (ATVPST), diâmetro médio dos elementos de vaso do xilema do pecíolo (DMEVP), área parênquima paliçádico do pecíolo (APP), área do pecíolo em seção transversal e área média dos elementos de vaso do pecíolo (AMEVP).

Cultivares		AXPST	AFPST	ATVPST	DMEVP	APP	APST	AMEVP	Rank Médio
		Rank	Rank	Rank	Rank	Rank	Rank	Rank	
Pau Brasil 2	T	2	3	4	14	5	5	5	5,43
Pau Brasil MG1	T	6	9	7	11	10	10	11	9,14
Catiguá MG1	T	3	16	15	9	7	8	9	9,57
Catiguá MG2	T	5	17	17	13	14	14	13	13,29
MG5 Catiguá 3	T	7	19	19	10	15	16	10	13,71
Sarchimor MG8840	NT	19	4	3	4	2	2	4	5,43
Oeiras MG6851	NT	15	15	16	2	3	3	2	8,00
Topázio MG1190	NT	13	10	6	8	11	11	8	9,57
C. Vermelho IAC144	NT	16	5	5	16	6	6	17	10,14
Rubi MG1192	NT	8	14	12	17	13	13	16	13,29
B. Amarelo MG0009	NT	14	13	13	18	20	20	18	16,57
M. Novo IAC379-19	NT	18	18	18	20	16	15	20	17,86
MG5 Aranãs	IN	4	2	2	3	4	4	3	3,14
MG5 Araponga 2	IN	1	1	1	12	1	1	12	4,14
Paraíso 3	IN	11	6	9	6	8	7	6	7,57
Paraíso 4	IN	10	7	8	15	9	9	15	10,43
MG5 Paraíso 2	IN	12	8	11	5	12	12	14	10,57
Sacramento MG1	IN	17	11	14	7	19	19	7	13,43
Paraíso MG H419-1	IN	20	20	20	1	17	18	1	13,86
Araponga MG1	IN	9	12	10	19	18	17	19	14,86



Fig.3: Cultivares de *cafeea arábica*, classificadas como tolerantes ao déficit hídrico de acordo com dados empíricos fornecidos pela EPAMIG, com base na no comportamento histórico das cultivares durante períodos de seca, e retomada das chuvas observado no campo. Catiguá MG1 (A), Catiguá Mg2 (B), Oeiras MG6851 (C), Pau Brasil MG1 (D) e Pau Brasil 2 (E).



Fig. 4: Cultivares de *Coffea arabica*, classificadas como indeterminadas quanto ao déficit hídrico de acordo com dados empíricos fornecidos pela EPAMIG, com base no comportamento histórico das cultivares durante períodos de seca, e retomada das chuvas observado no campo. Araponga MG1 (A), Paraíso MG H419-1 (B), MG5 Paraíso 21 (C), Pau Sacramento Mg1 (D), MG5 Aranãs (E), MG5 Araponga 2 (F), Paraíso 3 (G) e Paraíso 4 (H)



4. DISCUSSÃO

De acordo com o resultado das análises, a existência de variabilidade nas características anatômicas estudadas nas cultivares de café arábica, apresenta qualidade necessária para inserção das variáveis analisadas na avaliação e na seleção de genótipos superiores em um programa de melhoramento de café (TEIXEIRA et al. 2013, SILVA et al. 2017). Uma vez que apresentam herdabilidade e acurácia consideradas altas de acordo com a classificação de Resende (2007a). As características ELF, EPP, EPL, DEE, DNE e DNV são associadas ao potencial fotossintético das plantas. A espessura

da folha pode oferecer tanta proteção contra excesso de luz quanto maior resistência à difusão de gases (MARTINS et al., 2014). O parênquima clorofiliano tem papel crucial seja na capacidade de fixação de carbono pelos cloroplastos do parênquima paliçádico, como pelo armazenamento interno de CO₂ pelo parênquima lacunoso (MARTINS et al., 2014). Atualmente é sabido que a fotossíntese é limitada pela condutância mesofílica (g), que é a resistência para a transferência de CO₂ a partir dos espaços intercelulares (Ci) para os sítios de carboxilação no estroma cloroplástico (WARREN, 2008). As limitações de g são de magnitude semelhante às restrições estomáticas e geralmente maior do que limitações bioquímicas (FLEXAS et al. 2012).

Observamos que as cultivares consideradas tolerantes, apresentaram maiores valores quanto as variáveis associadas ao limbo foliar (Tab. 5 e Fig. 1). O que sugere que após um período de déficit hídrico, como o observado nas condições de campo durante a coleta do material vegetal analisado e posterior recuperação, essas cultivares ou mantêm a folha mais espessa, ou rapidamente se recuperam. Uma vez que, em geral, em condições de limitação de água normalmente há redução nos tecidos da folha, com objetivo de reduzir a perda de água.

Além disso, as variáveis relacionadas aos estômatos, como a DEE, DNE, são cruciais para o desempenho fotossintético, o influxo de CO₂ e o efluxo de vapor de água compartilham um caminho comum através dos poros estomáticos nas superfícies das folhas (MARTINS et al. 2014). Permitindo a transpiração mais eficiente, que se associa a produtividade, pois é sinal de alta condutância estomática, ou seja, maior abertura para captura de CO₂. Adicionalmente a DNV, se associa a capacidade de distribuição de fotoassimilados pelas folhas (TAIZ, 2015). Esses parâmetros anatômicos da folha impõe uma grande restrição à maximização das trocas gasosas em café, o que pode afetar a fotossíntese (MARTINS et al. 2014). A importância dos estômatos se dá por esse controle da entrada de CO₂ e perda de água. Sob condições de déficit hídrico, os estômatos são estimulados a se fecharem, reduzindo a evapotranspiração e, portanto, a perda de água, contribuindo para redução da embolia. (BRODRIBB et al., 2016).

Nossos resultados permitem inferir que as cultivares tolerantes apresentaram maior DEE e DNE, (Tab. 4 e 5), ou seja, possivelmente menor limitação de trocas gasosas, portanto maior potencial fotossintético. O maior número de estômatos pode ser uma adaptação à condição de limitação hídrica, pois em geral, quando há maior número esses apresentam menor ostíolo, oferecendo maior controle da abertura e menor perda de água.

A abertura e fechamento dos estômatos estão intimamente ligados não só a regulação hídrica, mas também aos componentes do xilema da planta, como o número e diâmetro dos elementos de vaso. Avaliar as características do tecido condutor é um meio muito econômico e eficiente para vincular o comportamento estomático com o status hídrico do xilema e a embolia (BRODRIBB et al., 2016). Principalmente durante períodos de estresse.

Além dessas variáveis que se associam a estruturas diretamente relacionadas à fotossíntese e fazem uma ligação entre o transporte dos produtos da fotossíntese, outras como a DNV, a AFFST, ATVFST e DMEVF se associam a capacidade de distribuição, tornando mais eficiente o transporte de fotoassimilados. Somados a essas variáveis a AXFST demonstra a capacidade de transporte de água e sais minerais. Além da importância por si só do transporte de água para hidratação, transpiração, reações metabólicas e transporte de nutrientes, (TAIZ, 2015).

Notamos uma maior DNV nas cultivares tolerantes (Fig. 1 e Tab. 5 e 6), o que indica que essas cultivares podem apresentar maior capacidade ou estrutura melhor adaptada à distribuição de água, minerais e produtos da fotossíntese.

O que confere a esses genótipos uma estrutura, ao menos inicialmente, melhor preparada para contornar situações de estresse. Pois a maior taxa de venação nas folhas, é uma característica evolutiva que permite uma melhor hidratação homogênea da lâmina foliar (BOYCE, 2005).

O que sugere que a condutância hidráulica da folha está intimamente relacionada à densidade de venação (BRODRIBB et al., 2007), a condutância estomática e a densidade estomática (FRANKS & BEERLING 2009). Uma ligação de desenvolvimento entre veias foliares e estômatos através do processo de expansão celular efetivamente equilibra o abastecimento de água para suprir a demanda transpiracional. Tornando a planta mais eficiente e produtiva (BRODRIBB et al., 2016)

De acordo com Martins et al. (2014) melhorias do desempenho fotossintético do café por meio de seleção genética de mecanismos que se associam a capacidade hidráulica da planta, DNV (venação) e condutância hidráulica (ligada a AXFSF, área foliar) podem gerar g_s mais elevados (diminuindo assim as limitações estomáticas da fotossíntese). Essa abordagem pode ser uma estratégia útil para facilitar a seleção de genótipos promissores com maior crescimento e produção, principalmente por as características avaliadas terem apresentado alta herdabilidade ($\geq 80\%$) e acurácia (maior que 90%).

A manipulação dessas características em um programa de melhoramento seria possível, uma vez que o padrão de venação depende de expressão gênica e rotas de transdução de sinal que podem ser alterados (SCARPELLA et al., 2004, CARINGELLA 2015). Alterações nesses parâmetros poderiam possibilitar a manutenção ou mesmo aumento das taxas fotossintéticas, pois a assimilação de CO₂ pode saturar a baixa densidade de venação (<2 mm²) (BOYCE e ZWIENIECKI 2012). Principalmente levando em conta à alta herdabilidade e acurácia apresentadas por essas variáveis (Tab. 1 e 2).

Esses valores indicam que o experimento foi conduzido adequadamente e os valores genéticos previstos foram bastante precisos, demonstrando assim a capacidade de aplicar facilmente a seleção usando esses recursos (SILVA et al. 2014). Modificações na capacidade hidráulica da folha através de aumentos na condutância hidráulica (parâmetros relacionados ao fluxo de água e troca de gasosas por área foliar, como maior espessura de mesófilo e relação EPP/EPL), são promissores para aumentar a plasticidade e a produtividade de indivíduos em condições adversas. Aumentos na condutância estomática podem ocorrer devido a um aumento no número de nervuras da folha (SACK, HOLBROOK, 2006). Como o café arábica, principalmente no Brasil, é cultivado a pleno sol, podemos sugerir que um programa de melhoramento genético que vise modificações nessas variáveis anatômicas é importante para o cenário futuro de limitação hídrica.

Valores entre 15 % e abaixo de 50% são considerados índices moderados para culturas perenes (RESENDE 2007a). Nossas variáveis, total de 31, apenas sete apresentaram herdabilidade abaixo de 70%. Sendo que as mais relevantes, quanto à participação no processo fotossintético (Tab. 1 e 2), apresentaram índices acima de 80%.

A alta acurácia obtida, para as características consideradas mais promissoras, variou de 83% a 97% (Tab. 1 e 2). Esses valores apresentam uma correlação entre os valores genéticos verdadeiros e os preditos, quanto maior, maior é a confiabilidade da avaliação do genótipo (RESENDE e DUARTE 2007). Uma vez, que valores acima de 70 % já são considerados altos (RESENDE 2007a).

O diâmetro dos elementos de vaso do xilema do pecíolo também se destacou como potencial marcador por sua herdabilidade e acurácia. Essa variável é importante, pois é responsável pelo transporte de água e sais minerais para a folha. Elementos de vaso menores impedem perda excessiva de água devido a redução da condutividade do

xilema e pode ajudar a prevenir a ocorrência de embolia (LOVISOLO et al. 2010), uma vez que os elementos de vaso menores são menos suscetíveis a cavitação (TYREE e DIXON 1986; DAVIS et al., 1999, HOCHEBERG 2015). Sendo, portanto, um parâmetro que deve ser levado em consideração quando se pretende manipular o sistema hidráulico das plantas.

5. CONCLUSÃO

Parâmetros anatômicos podem ser utilizados como ferramenta em programas de melhoramento genético visando seleção precoce de genótipos tolerantes ao déficit hídrico.

As discriminações dos genótipos de acordo com os dados de campo, foram coerentes com os resultados do ranqueamento.

As variáveis ELF, EPP, EPL, AFPST, AXPST, ATVFST, DMEVF, DEE, DNE, DNV, AXPST, AFPST, ATPVST, DMEVP, APP, ASTP e AMEVP diferem de forma significativa entre genótipos tolerantes e não tolerantes, e apresentam potencial para seleção de material tolerante ao déficit hídrico em cafeeiro.

A herdabilidade e acurácia das análises conferem credibilidade a inclusão de 17 variáveis como possíveis marcadores.

6. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal, e ao Laboratório de Anatomia Vegetal pela infraestrutura disponível e oportunidades de crescimento profissional.

À EPAMIG pela concessão do material e pelo apoio na realização do trabalho.

À Fapemig pela concessão da bolsa de iniciação científica.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Avaliação de 20 cultivares de *Coffea arabica* desenvolvidas pela Epamig. Estimativas de parâmetros genéticos relacionados ao limbo foliar: espessura da epiderme superior (EES), espessura da epiderme inferior (EEI), área média dos

elementos de vaso da folha (AMEVF), diâmetro dos elementos de vaso da folha em seção transversal (DEVFST), diâmetro polar dos estômatos (DPE), relação entre diâmetro polar e equatorial dos estômatos (DPE/DEE), relação entre a espessura do parênquima paliçádico e a espessura do limbo foliar (EPP/ELF).

Parâmetros:	EES	EEI	AMEVF	DEVFST	DPE	DPE/DEE	EPP/ELF
VG (δ^2g)	0,076274	0,196402	0	17473,87	0,718275	0,004671	2,402196
LRT	0,01	0,13	10,65	0,01	8,09	27,52	9,12
h²_{mc} (%)	4,52	12,16	65,97	3,27	61,25	81,27	63,31
AC_{gen} (%)	21,26	34,87	81,22	18,08	78,26	90,15	79,57
Média Geral	26,40088	20,85016	0,000208	2476,681	27,49955	1,434339	23,01379
BLUP mínimo	26,3254	20,5622	0,0001	2459,696	26,4005	1,3136	21,2528
BLUP máximo	26,4997	21,266	0,0006	2571,875	28,781	1,5453	26,036

Tabela S2. Avaliação de 20 cultivares de *Coffea arabica* desenvolvidas pela Epamig. Estimativas de parâmetros genéticos relacionados ao limbo foliar, relação entre a espessura do parênquima paliçádico e a espessura do limbo foliar (EPL/ELF), relação entre a espessura da epiderme superior e a espessura do limbo foliar (EES/ELF), relação entre a espessura da epiderme inferior e a espessura do limbo foliar (EEI/ELF), densidade de elementos de vaso do pecíolo (DNEVP), relação entre a área do xilema do pecíolo em seção transversal e a área de seção transversal do pecíolo (AXPST/ASTP), relação entre a área de elementos de vaso do pecíolo em seção transversal e área de seção transversal do pecíolo (AEPVST/ASTP), relação entre a área do parênquima do pecíolo e a área de seção transversal do pecíolo (APP/ASTP).

Parâmetros:	EPL/ELF	EES/ELF	EEI/ELF	DNEVP	AXPST/ASTP	AFPST/ASTP	APP/ASTP
VG (δ^2g)	10,05905	0,664116	0,458596	23517,91	0,244931	0,355773	1,08488
LRT	17,39	20,96	14,31	5,75	12,61	32,3	28,61
h²_{mc} (%)	74,17	77,14	70,96	55,44	68,84	83,55	81,83
AC_{gen} (%)	86,12	87,83	84,24	74,46	82,97	91,41	90,46
Média Geral	61,35969	9,294871	7,345832	1575,384	4,273617	4,606843	91,11954
BLUP mínimo	53,9721	7,7496	6,5297	1355,03	3,4396	3,4224	89,8661
BLUP máximo	65,9208	10,6846	8,3874	1802,975	4,8976	5,3445	93,2087

8. REFERÊNCIAS

Bouché, F., Lobet, G., Tocquin, P., Périlleux, C., 2016. FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Res** (D1) 44: D1167–D1171.

Boyce, C. K., and Zwieniecki, M. A., 2012. Leaf fossil record suggests limited influence of atmospheric CO₂ on terrestrial productivity prior to angiosperm evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 109, 10403–10408.

- Boyce, C. K., Brodribb, T. J., Feild, T. S., and Zwieniecki, M. A., 2009. Angiosperm leaf vein evolution was physiologically and environmentally transformative. **Proc. R. Soc. B.** 276, 1771–1776.
- Boyce, C. K., 2005. Patterns of segregation and convergence in the evolution of fern and seed plant leaf morphologies. **Paleobiology.** 31, 117–140.
- Brodribb, T. J., Feild, T. S., and Jordan, G. J., 2007. Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. **Plant Physiol.** 144, 1890–1898.
- Brodribb, T. J., McAdam, S. A. M., Jordan, G. J., Feild, T. S., 2009. Evolution of stomatal responsiveness to CO₂ and optimization of water-use efficiency among land plants. **New Phytologist.** 183, 839–847.
- Brodribb, T. J., Skelton, R. P., McAdam, S. A., Bienaimé, D., Lucani, C. J., Marmottant, P., 2016. Visual quantification of embolism reveals leaf vulnerability to hydraulic failure. **New Phytol.** 209: 1403–1409
- Brodribb, T. J., Jordan, G. J., and Carpenter, R. J., 2013. Unified changes in cell size permit coordinated leaf evolution. **New Phytol.** 199, 559–570.
- Büßis, D., VonGroll, U., Fisahn, J., Altmann, T. A., 2006, Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in *Arabidopsis thaliana* at growth light conditions. **Funct Plant Biol.** 33: 1037–1043
- Caringella, M. A., Bongers, F. G., Sack, L., 2015. Leaf hydraulic conductance varies with vein anatomy across *Arabidopsis thaliana* wild-type and leaf vein mutants. **Plant. Cell and Environment.** 38, 2735–2746.
- Cavatte, P. C., Oliveira, A. A., Morais, L. E., Martins, S. C., Sanflard, L. M., DaMatta, F. M., 2012. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee?: a morphophysiological analysis. **Physiologia Plantarum**, v. 144, p. 111-122.
- Cowan, I. R., Farquhar, G. D., 1977. Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. **Symposium of the Society for Experimental Biology.** 31, 471–505.
- DaMatta, F. M., Ramalho, J. D. C., 2006. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology.** 18: 55-81.
- Davis, S. D., Sperry, J. S., Hacke, U. G., 1999. The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. **American Journal of Botany.** 86, 1367–1372.
- De Boer, H. J., Price, C. A., Wagner-Cremer, F., Dekker, S. C., Franks, P. J. and Veneklaas, E. J. 2016. Optimal allocation of leaf epidermal area for gas exchange. **New Phytologist**, 210, 1219-1228.

Doheny-Adams, T., Hunt, L., Franks, P. J., Beerling, D. J., Gray, J. E., 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 367: 547–555.

Dow, G. J., Bergmann, D. C., and Berry, J. A., 2014. An integrated model of stomatal development and leaf physiology. **New Phytol.** 201, 1218–1226.

Drake, P. L., Froend, R. H., Franks, P. J., 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. **J Exp Bot** 64:495–505

Fiorin, L., Brodribb, T. J., and Anfodillo, T., 2016. Transport efficiency through uniformity: organization of veins and stomata in angiosperm leaves. **New Phytologist**, 209, 216-227.

Flexas, J., Barbour, M. M., Brendel, O., Cabreraa, H. M., Carriquí, m., Díaz-Espejof, A., Doutheç, C., Dreyer, E., Ferriog, J. P., Gagoa, J., Galléa, A., Galmés, J., Kodama N., Medranoa, H., Niinemets, U., Peguero-Pinaa, J. J., Poua, A., Ribas-Carbóa, M., Tomás, M., Tosens, T., Warren, C. R., 2012. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: an unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science.** 193–194 70–84.

Franks, P. J., Beerling, D. J., 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 106, 10343–10347.

Franks, P. J., Farquhar, G. D., 2007. The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. **Plant Physiol** 143: 78–87

Gay, A. P., Hurd, R. G., 1975. The influence on light intensity on stomatal density in the tomato. **New Phytologist.** 75, 37–46.

Gray, J. E., Holroyd, G. H., Van der Lee, F. M., Bahrami, A. R., Sijmons, P. C., Woodward, F. I., Schuch, W., Hetherington, A. M., 2000. The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. **Nature** 408, 7:3

Hetherington, A. M., Woodward, F. I., 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. **Nature** 424: 901–908.

Hochberg, U., Degu, A., Gendler, T., Fait, A., Rachmilevitch. S., 2015. The variability in the xylem architecture of grapevine petiole and its contribution to hydraulic differences. **Funct Plant Biol** 42:357–365

Johansen, D. A., **Plant microtechnique.** New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

Knipfer, T., Eustis, A., Brodersen, C., Walker, A. M., McElrone, A. J., 2015. Grapevine species from varied native habitats exhibit differences in embolism formation/repair associated with leaf gas exchange and root pressure. **Plant Cell Environ.** 38: 1503–1513

- Lovisoló, C., Perrone, I., Carra, A., Ferrandino, A., Flexas, J., Medrano, H., Schubert, A., 2010. Drought-induced changes in development and function of grapevine (*Vitis* spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level: a physiological and molecular update. **Funct Plant Biol.** 37:98–116
- Martins, S. C. V., Galmés, J., Cavatte, P. C., Pereira, L. F., Ventrella, M. C., DaMatta, F. M., 2014. Understanding the low photosynthetic rates of sun and shade coffee leaves: bridging the gap on the relative roles of hydraulic, diffusive and biochemical constraints to photosynthesis. **Plos One**, 9(4): e95571.
- Medlyn, B. E., Duursma, R. A., Eamus, D., Ellsworth, D. S., Prentice, I. C., Barton, C. V. M., Crous, K. Y., De Angelis, P., Freeman, M., and Wingate, L., 2011. Reconciling the optimal and empirical approaches to modelling stomatal conductance, **Global Change Biol.** 17: 2134–2144.
- Merlot, S., Mustilli, A.C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A. and Giraudat, J., 2002. Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. **The Plant Journal**, 30: 601–609.
- Mulamba, N. N., Mock, J. J., 1978. Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, Alexandria, v. 7, n. 1, p. 40– 51.
- Nardine, A., Öunapuu-Pikas, E., 2014. When smaller is better: Leaf hydraulic conductance and drought vulnerability correlate to leaf size and venation density across four *Coffea arabica* genotypes. **Functional Plant Biology.** 41: 972–982.
- O’Brient, T., Feder, N., McCully, M. E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O. Protoplasma.** 59, 367-373.
- Resende, M. D. V., 2007a. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético.** Embrapa Florestas, Colombo. 435 p.
- Resende, M. D. V., 2007b. **Software SELEGEN – REML/BLUP: Sistema estatístico e seleção computadorizada via modelos lineares mistos.** Embrapa Florestas, Colombo, 359p.
- Resende, M. D. V., Duarte, J. B., 2007. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, p.182-194.
- Sack, L., and Scoffoni, C., 2013. Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. **New Phytol.**198, 983–1000.
- Sack, L., Cowan, P., Jaikumar, N., and Holbrook, N. (2003). The ‘hydrology’ of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. **Plant Cell Environ.** 26: 1343–1356.

Sack, L., Holbrook, N. M., 2006. Leaf hydraulics. **The Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 361-381,

Scarpella, E., Francis, P., and Berleth, T., 2004. Stage-specific markers define early steps of procambium development in Arabidopsis leaves and correlate termination of vein formation with mesophyll differentiation. **Development** (Cambridge, England) 131, 3445–3455.

Schluter, U., Muschak, M., Berger, D., Altmann, T., 2003. Photosynthetic performance of an Arabidopsis mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany** 54, 867–874

Strittmatter, C. G. D., 1973. Nueva técnica de diafanizaci 1.**Boletni de la Sociedad Argentina de Botânica** 15(1): 126-129.

Trifilo, P., Raimondo, F., Savi, T., Lo Gullo, M. A., Nardini, A., 2016. The contribution of vascular and extra-vascular water pathways to drought-induced decline of leaf hydraulic conductance. **J Exp Bot.** 67: 5029–5039.

Tyree, M. T., Dixon, M. A., 1986. Water stress induced cavitation and embolism in some woody plants. **Physiologia Plantarum.** 66: 397–405.

Warren, C. R., 2008. Stand aside stomata, another actor deserves centre stage: the forgotten role of the internal conductance to CO transfer. **J Exp Bot.** 59:1475–1487.

Woodward, F. I., 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from preindustrial levels. **Nature** 327, 617–618.

Yang, S. J., Sun, M., Zhang, Y. J., Cochard, H., and Cao, K. F., 2014. Strong leaf morphological, anatomical, and physiological responses of a subtropical woody bamboo (*Sinarundinaria nitida*) to contrasting light environments. **Plant Ecology**, 215, 97-109.

Zang, Y., Chen, B., Xu, Z., Shi, Z., Chen, S., Huang, X., Chen, J., Wang, X., 2014. Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. **Journal of Experimental botany**, Vol. 65, No. 12, pp. 3189–3200.