



ALEXIS FERNANDO MATUTE MATUTE

**RESPOSTAS ANTIOXIDANTES E TROCAS
GASOSAS EM CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)
INOCULADO COM *Cercospora coffeicola* Berk. &
Cook. E SUBMETIDO À DEFICIÊNCIA
HÍDRICA**

**LAVRAS/MG
2014**

ALEXIS FERNANDO MATUTE MATUTE

**RESPOSTAS ANTIOXIDANTES E TROCAS GASOSAS EM CAFEIEIRO
(*Coffea arabica* L.) INOCULADO COM *Cercospora coffeicola* Berk. &
Cook. E SUBMETIDO À DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa

Coorientador

Prof. Dr. José Donizeti Alves

**LAVRAS/MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Matute, Alexis Fernando Matute.

Respostas antioxidantes e trocas gasosas em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) inoculado em *Cercospora coffeicola* Berk & Cook e submetido à deficiência hídrica / Alexis Fernando Matute Matute. – Lavras : UFLA, 2014.

27 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa.

Bibliografia.

1. Estresse hídrico. 2. *Cercosporiose*. 3. Lâminas de irrigação.
4. Formação de mudas. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 583.52041

A minha mãe, irmãs e sobrinhos, pilares fundamentais e motivo de inspiração
para alcançar cada meta proposta durante minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por fazer possível cada conquista durante meu passar pela vida acadêmica.

Ao Governo da Revolução Cidadã, encabeçada pelo economista Rafael Correa Delgado, Presidente da República do Equador, pela oportunidade de obtenção do título de quarto nível fora das fronteiras pátrias.

À *Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología* (SENESCYT), do Governo Equatoriano, pelo suporte financeiro durante o processo de obtenção do título de Mestre.

A minha mãe, Olga Marlene Matute, por ser, além de mãe, uma amiga sempre pronta a me aconselhar e indicar os caminhos certos da vida. as minhas irmãs María Jose e Michelle por me demonstrarem amizade, carinho e companheirismo.

Ao meu tio Leonardo Gonzalo Matute, que sempre priorizou minha educação, e talvez, a pessoa mais influente em cada uma das minhas conquistas acadêmicas.

Ao Professor João Paulo Barbosa por me aceitar como orientado de mestrado e pela paciência, conselhos, discussões e auxílios durante o período de experimento.

Aos professores José Donizeti Alves, Antonio Chalfun Jr. e Luiz Edson Mota pela ajuda e disponibilização dos laboratórios para as diferentes análises experimentais.

Ao pessoal do LEFE: Marcelo, Hugo, Larissa, Nayara, Marcela, Kamilla, Mario, Maíra, Daynara, Ana Luiza e Fernando pela ajuda durante as avaliações do experimento. Sem dúvidas a melhor turma de pesquisa do mundo!

A meus grandes amigos, Jean Marcel, Marília Carneiro, Hugo Bentzen, Ana Cristina, Mariana Artur, Débora Domiciano, Débora Oliveira, Adolfo Santos e Joaz Vieira por todas aquelas risadas e momentos compartilhados durante a vida de mestrado, fazendo dela mais leve.

Ao pessoal técnico, Odorencio, Joel, Dartagnan e a Lena pelo suporte e amizade. Em fim, a todas as pessoas que acreditaram sempre em mim.

RESUMO

No presente trabalho, objetivou-se avaliar o comportamento de trocas gasosas e respostas enzimáticas antioxidantes em cafeeiros de seis meses de idade submetidos a diferentes lâminas de irrigação sob infecção de *Cercospora coffeicola*, em casa de vegetação. Foram analisadas as respostas das plantas inoculadas (INOC) e não inoculadas (nINOC) pelo fungo, sob três lâminas de irrigação (1,2; 0,6 e 0,1 mm dia⁻¹) e a interação destes dois fatores, aos 6, 9, 12, 18, 24 e 36 dias após inoculação (DAI). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial triplo com 35 repetições. A cada tempo, foram avaliadas as seguintes características: Potencial hídrico máximo (Ψ_{pd}), Potencial hídrico mínimo (Ψ_{md}), fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s), Transpiração (E), Eficiência de uso da água (EUA), Eficiência de uso da luz (EUL) e as atividades das enzimas Dismutase do superóxido (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase do ascorbato (APX). Em geral, não se observou diferenças significativas para as variáveis analisadas, dentro dos tratamentos, para os tempos 6, 9, 12, com menores valores que 18, 24 e 36 DAI. Os valores de Ψ_{pd} e Ψ_{md} foram maiores em plantas inoculadas (-0,85 e -1,96 MPa). As variáveis de trocas gasosas apresentaram maiores valores em plantas não inoculadas conforme o incremento da lâmina de irrigação, entretanto para plantas inoculadas os valores de A e g_s alcançaram valores máximos com 0,6 mm.dia⁻¹. A EUA diminuiu com incremento dos regimes de irrigação, mas, sempre com valores inferiores para plantas inoculadas. A EUL apresentou maiores valores em plantas não inoculadas e com incremento com a lâmina de irrigação. O sistema enzimático antioxidante apresentou incremento na atividade com lâminas de irrigação inferiores a 1,2 mm.dia⁻¹ com exceção da SOD que manteve maior atividade quanto maior a disponibilidade hídrica.

Palavras-chave: Estresse hídrico. Cercosporiose. Lâminas de irrigação. formação de mudas.

ABSTRACT

This study aims to evaluate leaf gas exchanges and antioxidant enzymatic system responses in coffee seedlings (*C. Coffeicola*) under several manipulations of soil water availability and infection exposure (*cercospora coffeicola*) in environmentally controlled conditions. Infected and non-infected leaf responses were analyzed under three irrigation levels (1,2;0,6 e0,1mm.day-1) as well as interactions during the 6th, 9th,12th, 18th, 24thand 36th day after the *C. Coffeicola* inoculation (DAI). Thus, a randomized experimental design was used with a factorial triplicate with 35 replications. Every evaluation tracked several characteristics including: maximum and minimum hydro potential in leaves (Ψ_{pd} , Ψ_{md}), net photosynthesis (A), stomatal conductance (g_s), transpiration (E), water use efficiency (WUE), light use efficiency (LUE) and antioxidant enzymatic activity (SOD, CAT, APX). There was not a significant difference for all variables analyzed between treatments for the 6th, 9th, 12th days and neither the 18th, 24th and 36th days, therefore, the initial values showed lower ranks. Maximum and minimum hydro potential was found in the infected plants (0,85 and 1,96 MPa), high leaf gas exchange values were found in uninfected plants according to an irrigation increase; however, in the infected plants these values reached maximum values inside 0,6 mm.day-1. WUE decreased with higher irrigation levels, but with low values in infected plants. LUE, presented high values in uninfected plants according to irrigation increase. Antioxidant enzymatic system showed high activity under hydro deficiency conditions (less 1,2 mm.day-1) with an exception in SOD enzyme activity, which maintained high activity in optimal plant hydro conditions.

Keywords: Water stress, Cercosporiose, irrigation levels, coffee seedlings.

LISTA DE SIGLAS

EDTA:	Ácido Etileno Diamino Tetra-acético
NBT:	<i>p</i> -nitro tetrazólio
PVC:	Policloreto de Vinila
BDA:	Batata Dextrose Ágar
SOD:	Dismutase do Superóxido
CAT:	Catalase
APX:	Peroxidase do Ascorbato
PVPP:	Polivinil-Poli-Pirrolidona
A:	Fotossíntese Líquida
g_s :	Condutância Estomática
Ψ_{pd} :	Potencial Hídrico Máximo
Ψ_{md} :	Potencial Hídrico Mínimo
E	Transpiração
EUA	Eficiência de Uso da Água
EUL	Eficiência de Uso da Luz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Caracterização experimental.....	18
3.2 Indução do déficit hídrico.....	19
3.3. Preparo e inoculação de <i>Cercospora coffeicola</i>	19
3.4. Desenho experimental.....	20
3.4.1. Trocas gasosas	20
3.4.2. Atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo	21
3.4.3. Relações hídricas	22
3.4.4. Avaliação das condições ambientais da casa de vegetação.	22
3.5. Análise de dados	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Condições ambientais da casa de vegetação.....	24

4.2 Potencial hídrico	25
4.3. Trocas gasosas	26
4. 4. Sistema enzimático antioxidante.....	30
5. CONCLUSÕES	34
6. BIBLIOGRAFIA	35

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura, representada na sua ampla maioria pelas espécies arábica (*Coffea arabica* L.) e robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner), é de grande importância para a economia dos países produtores. Segundo Arruda (2013) a Companhia Nacional De Abastecimento - CONAB o Brasil possui cerca de 6,7 bilhões de covas, variando entre pés em formação e produção. Desse total, aproximadamente cinco bilhões são das variedades Mundo Novo e Catuaí.

Entretanto, a cultura do cafeeiro apresenta alguns fatores ambientais de caráter bióticos e abióticos que afetam diretamente os volumes de produção. Seja por impactar negativamente lavouras em produção ou por elevar as perdas de plantas em lavouras em implantação. Por exemplo, o déficit hídrico prolongado ou períodos de veranico (quando elevadas temperaturas associadas a elevados níveis de radiação e escassez de chuvas causam déficit hídrico severo) apresenta-se como uma das grandes barreiras para a lavoura em fase de implantação e/ou nos primeiros anos de estabelecimento, devido a danos severos nos processos fisiológicos e bioquímicos das mudas. Somado a isso, a incidência de doenças, particularmente aquelas ocasionadas por fungos, podem resultar em perdas, uma vez que muitas dessas doenças aproveitam os baixos níveis de respostas de defesa da planta estressada, pelo que uma combinação desses fatores poderia levá-la à morte.

Entre as principais doenças que acometem o cafeeiro, encontra-se a Cercosporiose, caracterizada pelo ataque direto do fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cook. aos tecidos foliares, em que o êxito da infecção baseia-se nos níveis de resistência da planta. Níveis que podem ser comprometidos se as

condições hídricas do solo não satisfazem a demanda exigida para o bom funcionamento da planta.

Apesar da importância da expansão da cultura cafeeira nos países produtores, existem diversas lacunas no conhecimento a respeito do comportamento fisiológico da planta em fase inicial com a interação doença x estresse hídrico. Contudo existe uma grande demanda dessas informações, a fim de subsidiar inovações nas técnicas de manejo de plantios em fase de estabelecimento. Desta maneira é importante conhecer e quantificar alterações e os potenciais impactos negativos frente a interações desses tipos de estresses.

Diante disso, objetivou-se estudar as respostas fisiológicas relacionadas às trocas gasosas e ao sistema antioxidante de plantas jovens de cafeeiro arábica inoculadas com *C. coffeicola* e submetidas a três níveis de disponibilidade hídrica definida por lâminas de irrigação (1,2; 0,6 e 0,1 mm.dia⁻¹). Este tipo de conhecimento permitirá subsidiar o desenvolvimento de possíveis alternativas de manejo para diminuição do impacto econômico, causado por estresses ambientais, durante a formação de mudas e o desenvolvimento inicial do cafeeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A cultura de café é uma das culturas de maior importância na economia mundial, envolvendo mais de 500 milhões de pessoas nas diferentes etapas de produção até a comercialização do produto final. Os principais países produtores de café, com 70% da produção mundial, são: Brasil, Vietnã, Indonésia e Colômbia. Dentre as 100 espécies do gênero *Coffea*, apenas *C. arabica* L. (Cafeeiro arábica) e *C. Canephora* Pierre ex A. Froehner (Cafeeiro robusta) são economicamente importantes e responsáveis por 99% da produção do fruto (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION – ICO, 2013).

A espécie arábica é economicamente a mais importante do gênero *Coffea* e responde por cerca de 70% do café comercializado mundialmente (ICO, 2013). É nativa das terras altas da Etiópia, e atualmente é cultivada no continente americano, na África e na Ásia. Apresenta bebida de qualidade superior, de aroma marcante e sabor adocicado, sendo largamente difundida no mundo, consumida pura ou em misturas com outras espécies de cafés.

A planta de café arábica apresenta valores médios de $7,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fotossíntese líquida (A) e $108 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de condutância estomática (g_s) (CHAVES et al., 2008; CAVATTE et al., 2008). Entretanto, sobre condições de deficiência hídrica esses valores podem diminuir, e a magnitude da redução depende do genótipo, estado nutricional, intensidade luminosa e condições fitossanitárias.

Em condições de estresse abiótico, incluindo temperaturas elevadas e deficiência hídrica, a fotossíntese é particularmente sensível, seja por efeitos fotoquímicos como a deficiência do funcionamento do PSII ou degradação dos tilacoides; seja por problemas bioquímicos como a desativação da RUBISCO ou

de outras enzimas do ciclo de Calvin (DAMATTA, 2006; LIMA, et al., 2002). Sob estresse, há o estímulo da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), em grande parte pela oxigenação da RUBISCO, o que pode reduzir a fotossíntese e comprometer o metabolismo de carbono das plantas (SHARKEY, 2005).

O estresse hídrico também pode ocasionar alterações na anatomia foliar (GRISI et al., 2008), diminuição no diâmetro de caule, altura da planta, número de nós por ramo, número de ramos por planta (GOMES; LIMA; CUSTÓDIO, 2007), na biosíntese de carboidratos não estruturais, e decréscimo na produção de enzimas que participam na síntese de sacarose e aumento na produção de amilases (ROLLAND et al., 2006). Tudo isso pode levar a perdas econômicas consideráveis. Assim vários trabalhos têm demonstrado perdas na produção de café, de até 60%, após suspensão de irrigação, quando os valores de potencial hídrico de folhas estiveram abaixo de -1 MPa (ARRUDA, 2003).

Outro fator a ser considerado na alteração do comportamento fotossintético e metabólico de mudas de café no seu estágio inicial são as doenças. Dentre as principais, destaca-se a Cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* Berk e Cook, responsável por intensa desfolha, atraso no crescimento e raquitismo de plantas (FERNANDEZ-BORRERO, et al., 1966). *C. coffeicola* infecta folhas e frutos ocasionando perdas na produtividade, estimadas de 35 a 40% (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). O êxito da doença baseia-se nos níveis de resistência da planta, níveis que podem ser comprometidos se as condições hídricas do solo não satisfazem a demanda exigida para o seu bom funcionamento.

Esse tipo de doença apresenta-se principalmente nas folhas, iniciando-se com pequenas manchas circulares de coloração marrom-escura, que crescem

rapidamente, ficando o centro das lesões cinza-claro, com um anel arroxeado ou amarelado em torno da lesão, o que lhe confere a aparência de um olho, (CARVALHO; CHALFOUN, 2000). As lesões variam muito de tamanho, desde poucos milímetros, no início, até 1 cm no final, podendo-se observar, nessa fase, no centro das lesões, pequenos pontos pretos, que são as frutificações do fungo. As folhas atacadas caem rapidamente, ocorrendo desfolhas e seca de ramos (Die Back). A desfolha é causada pela grande produção de etileno no processo de necrose, sendo que basta uma lesão por folha para causar sua abscisão (CHALFOUN, 1997).

Uma das características principais em espécies vegetais submetidas a condições de estresse, seja biótico ou abiótico, é a produção e acúmulo de H_2O_2 , que pode ocorrer devido a um excesso de poder redutor gerado pela reduzida atividade do Ciclo de Calvin no processo fotossintético, fazendo com que os elétrons sejam utilizados para reduzir o oxigênio molecular e a consequente formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos as quais são altamente citotóxicas e podem reagir com várias biomoléculas, entre elas, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, causando peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e mutações no DNA, respectivamente (BREUSEGUEM et al., 2001; QUILES; LÓPEZ, 2004).

Dentre as principais ROS, destacam-se: o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-) (APEL; HIRT, 2004). Em condições naturais, ocorre baixa produção de ROS, enquanto que em condições de estresse esse padrão tende a aumentar, provocando danos e injúrias nos tecidos vegetais (LIMA et al., 2002).

As plantas possuem diferentes mecanismos de defesa à ação das ROS, que fornecem informações relevantes do seu comportamento frente às condições

de estresse, destacando-se: i) mecanismo de defesa antioxidante enzimático envolvendo a atividade da Dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e Peroxidase do Ascorbato (APX), atuando nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos; ii) produção de compostos clorofilados e carotenoides (CANDAN; TARHAN, 2003; JIMÉNEZ et al., 1998). Maior atividade dessas enzimas em mudas de café arábica foi observada após 21 dias da suspensão da irrigação (DEUNER et al., 2011).

A SOD possui maior atividade no interior das células removendo o radical superóxido (O_2^-) e gerando como subproduto o H_2O_2 e O_2 , evitando a formação de radicais hidroxila (OH^\cdot). Já as enzimas CAT e APX, removem o H_2O_2 , transformando-os em H_2O . No caso dos pigmentos, variações nos seus teores foliares podem fornecer informações relevantes sobre o estado fisiológico das plantas e como estas respondem a fatores de estresse (SIMS; GAMON, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização experimental.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia, no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e Funcionamento de Ecossistemas (LEFE); e no laboratório de Bioquímica e Metabolismo de Plantas da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada no município de Lavras (21° 13' 40'' S e 44° 57' 50'' W GRW), região Sul do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.

As mudas de *C. arabica* foram obtidas de viveiro particular da cidade de Lavras. Posteriormente, foram selecionadas e transferidas para sacos de polietileno (24,0 x 13,5 cm) que continha composto de areia, com volume de 3,5 litros de substrato. Antes da imposição dos tratamentos, as mudas passaram por um período de aclimação em que se utilizaram soluções nutritivas com concentrações crescentes durante os primeiros 21 dias, começando com ¼ da força, ½ força e força completa com intervalos de sete dias. Após o período de aclimação, realizou-se a adubação completa semanalmente com macro e micronutrientes via solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), até alcançarem seis meses de idade. As atividades envolvidas durante o período experimental são detalhadas na Figura 1.

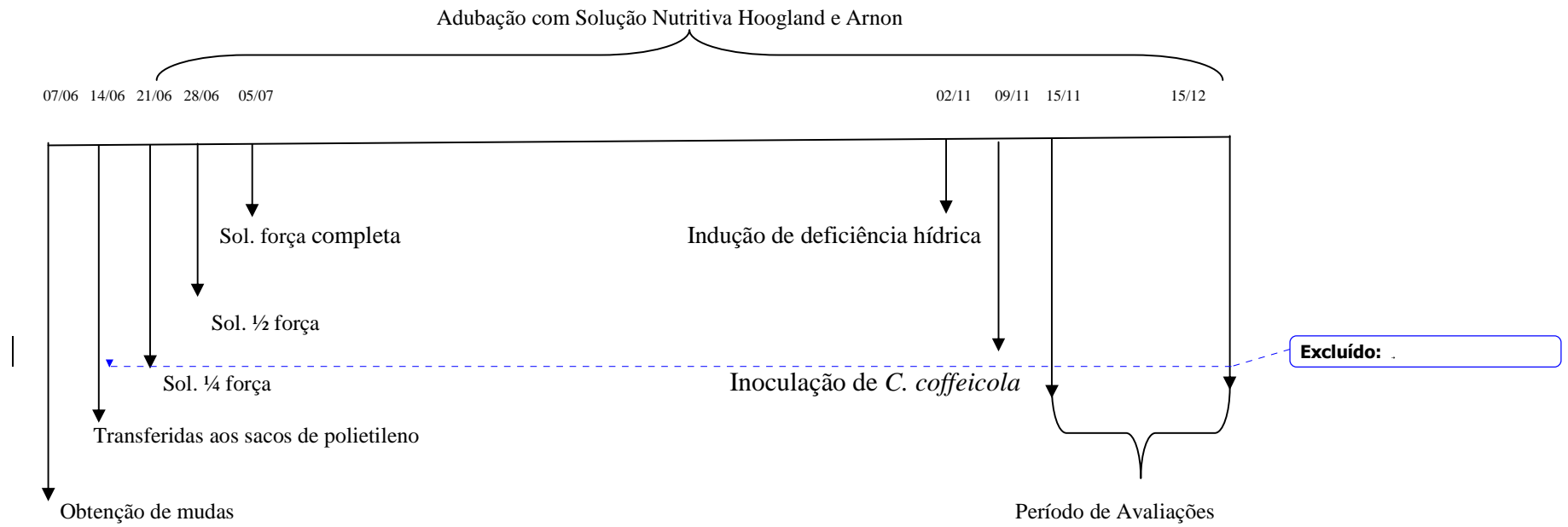


Figura 1 Cronograma de atividades durante o período experimental.

3.2 Indução do déficit hídrico

A capacidade de Campo (CC) do substrato foi determinada a partir de três amostras de substrato com uma massa de 200 g, que foram secas em estufa de circulação forçada a 70 °C, pelo período de 72 horas. Após secagem, determinou-se a massa do solo seco e em seguida foi feita a saturação do substrato com água deixando transcorrer mais de 48 horas até que a água pudesse percolar, restando somente a quantidade retida pelas partículas do solo. Assim, foi possível determinar o valor de 0,25 m³ m⁻³. Para os diferentes tratamentos de disponibilidade hídrica, foram aplicadas lâminas de água de 1,2; 0,6 e 0,1 mm.dia⁻¹, que permitiram manter o substrato em 100, 50 e 25% de água disponível, monitorando a cada cinco dias pelo sensor de umidade *mL2x* (*Delta-T devices*). As diferentes lâminas de irrigação foram aplicadas 7 dias antes da inoculação com *C. coffeicola* (Figura1).

3.3 Preparo e inoculação de *Cercospora coffeicola*

Os esporos de *Cercospora coffeicola* foram coletados a partir de folhas infectadas e crescidos em placas de petri contendo meio de cultivo BDA (Batata, Agar, Dextrose). Utilizou-se a técnica de obtenção de micélio de acordo com a produção de conídios, conforme descrito por SOUZA et al. (2011), utilizando-se três discos de micélios de colônias transferidos a 10 mL de meio V8 (200 mL V8 mais 800 mL de água destilada) em *erlenmeyers* de 25 mL, agitados continuamente a 120 rpm a 25 °C. Após quatro dias, o conteúdo de cada *erlenmeyer* foi transferido para placas de petri com água e ágar 1,5%. As placas de petri foram mantidas por mais quatro dias de incubação, até atingir a concentração final de 2.10⁴ conídios mL⁻¹.

A partir desta concentração, realizaram-se as aspersões de conídios com ajuda de atomizador e dirigido à folhagem nos três primeiros pares de folhas tanto na superfície adaxial quanto na abaxial das mudas.

3.4 Desenho experimental

Foram analisadas as respostas das plantas sob três lâminas de irrigação, sob a infecção com Cercosporiose e a interação destes dois fatores mm.dia^{-1} . As avaliações foram realizadas em folhas maduras, totalmente expandidas, sem sinais de injúrias por pragas ou patógenos aos 6, 9, 12, 18, 24 e 36 dias após inoculação (DAI) de conídios de *C. coffeicola*. Aos 36 DAI, os sintomas visuais da Cercosporiose começaram a aparecer e as avaliações foram interrompidas, uma vez que as manchas necróticas nas folhas dos tratamentos infectados afetariam largamente as trocas gasosas e a atividade do sistema antioxidante.

3.4.1 Trocas gasosas

A taxa de fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s) e a transpiração (E) foram medidas entre 9 e 11 horas, em sistema aberto, sob radiação fotossinteticamente ativa constante de $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótonse concentração de CO_2 ambiente, utilizando um analisador portátil de gás por infravermelho (IRGA, Li-Cor, modelo LI-6400 XT). Além disso foi determinada a Eficiência do uso da água (EUA) e Eficiência do uso da luz (EUL) segundo as seguintes equações:

$$EUA = \frac{A}{E} \quad \text{Equação 1.}$$

$$EUL = \frac{A}{1000 \mu\text{mol de fótons}} \quad \text{Equação 2.}$$

3.4.2 Atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo

Foi determinada a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977; LIMA et al., 2002), catalase (CAT) (HAVIR; MCHALE, 1987; LIMA et al., 2002) e da peroxidase do ascorbato (APX) (NAKANO; ASADA, 1981; LIMA et al., 2002) em tecidos foliares. As amostras foram obtidas utilizando almofariz, na presença de nitrogênio líquido, contendo 60 mg de PVPP e 1,5 mL dos seguintes meios de extração: para SOD (100 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,8, 0,1 mM EDTA e 0,1% Triton X-100); para CAT (100 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,8 e 0,1 mM EDTA) e para APX (50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,8 e 1 mM de ascorbato).

A mistura resultante foi centrifugada por 15 minutos a 11.800 rpm a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado nas avaliações das atividades enzimáticas.

A atividade total da SOD foi determinada medindo sua capacidade de redução fotoquímica do azul de *p*-nitro tetrazólio (NBT) de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Cada 5 mL do extrato de reação foi composto por: 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,8, 14 mM metionina, 75 μM NBT, 0,1 μM EDTA, 5 μl do extrato enzimático e 2 μM de riboflavina. A

produção de formazana azul resultante da foto-redução do NBT foi monitorada pelo incremento na absorbância a 560 nm como descrito por MARTINEZ et al. (2001). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da foto-redução do NBT.

A atividade da CAT foi estimada pela taxa de decomposição de H_2O_2 a 240 nm (HAVIR; MCHALE, 1987). Cada cinco mililitros do extrato de reação foi composto por 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, 12,5 mM de H_2O_2 e 20 μ l do extrato enzimático. Uma unidade da CAT definiu-se como a quantidade de enzima requerida para decompor 1 μ mol (H_2O_2) minuto⁻¹.

A atividade total da APX foi determinada monitorando o declínio na absorbância a 290 nm segundo Nakano e Asada (1981). Cada cinco mililitros do extrato de reação foi composto por 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, 0,1 mM de H_2O_2 e 20 μ l do extrato enzimático. Uma unidade da APX definiu-se como a quantidade de enzima requerida para oxidar 1 μ mol (ascorbato) minuto⁻¹.

3.4.3 Relações hídricas

O estado hídrico das plantas foi monitorado a partir de avaliações do potencial hídrico das folhas, realizadas antes do amanhecer (Ψ_{pd} máximo) e por volta do meio-dia (Ψ_{md} mínimo). Essas medidas foram determinadas utilizando a câmara de pressão de Scholander (PMS *Instruments- PlantMoisture-* Modelo 1000).

3.4.4 Avaliação das condições ambientais da casa de vegetação.

Além das avaliações descritas anteriormente, valores de temperatura máxima e mínima (T °C) e umidade relativa (UR %) foram registrados com auxílio de um termo-higrômetro digital com datalogger (Minipa, modelo

RHT10) instalado a 1,0 m de altura do solo e no centro da área experimental, no intervalo de 9 - 11 horas. O Déficit de Pressão de Vapor (DPV) do local onde foi realizado o experimento foi calculado segundo a Equação 1, proposta por JONES (1992).

$$DPV = 0,6137e^{\left(\frac{1-UR}{100}\right)} \quad \text{Equação 3}$$

onde “t” é calculado pela Equação 4:

$$t = \frac{17,502 * (T \text{ } ^\circ\text{C})}{240,97 + (T \text{ } ^\circ\text{C})} \quad \text{Equação 4}$$

3.5 Análise de dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em fatorial triplo 3 x 2, com três lâminas de irrigação, inoculação e não inoculação de *C. coffeicola*, com seis tratamentos, tendo 35 repetições por tratamento, contabilizando 210 plantas. Inicialmente foi testada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, foi realizada análise de variância entre os DAI dentro de cada tratamento, visando verificar a influência do tempo nas respostas fisiológicas avaliadas. Os dados foram submetidos a teste de médias (Scott-Knott com 5% de probabilidade)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das datas dentro de cada tratamento evidenciou apenas duas etapas diferentes para todas as características avaliadas. Os 6, 9 e 12 DAI foram semelhantes entre si e diferentes dos 18, 24 e 36 DAI, que por sua vez também foram semelhantes entre si. Dessa forma, optou-se por avaliar as respostas apenas em dois momentos: o tempo 1 (T1), composto pelos valores observados para os tratamentos aos 6, 9 e 12 DAI e o tempo 2 (T2), composto pelos valores observados aos 18, 24 e 36 DAI.

4.1 Condições ambientais da casa de Vegetação.

Após a análise de comparação temporal das características fisiológicas avaliadas dentro de cada tratamento, analisou-se os valores médios de temperatura do ar e do DPV em cada tempo, a fim de verificar se ocorreram variações significativas nessas variáveis, capazes de afetar especialmente as variáveis de trocas gasosas. Para o T1 os valores observados foram $44,0 \pm 3,9$ °C e $6,5 \pm 2,0$ kPa e para o T2 foram de $36,0 \pm 5,2$ °C e $3,6 \pm 2,5$ kPa. Esses valores correspondem aos valores médios de cada meia hora no intervalo 9 h - 11 h, período em que foram realizadas as avaliações do experimento.

Não foram observadas diferenças entre os valores médios observados para essas condições ambientais, indicando que as diferenças observadas para as características fisiológicas entre T1 e T2 se devem a efeitos de tratamento, e não a alterações de condição ambiental na casa de vegetação.

4.2 Potencial hídrico

De acordo com os resultados obtidos, observou-se diferenças de potencial hídrico foliar entre T1 e T2 apenas para as plantas sob regime de irrigação de 0,1 mm.dia⁻¹. Para o T1 os valores do potencial hídrico máximo (Ψ_{pd}) em plantas inoculadas com *C. coffeicola* diminuíram quanto maior a quantidade de água fornecida ao solo (1,2 mm.dia⁻¹), demonstrando maior déficit hídrico na etapa inicial de infestação. Entretanto, para o T2, o comportamento foi diferente ao anterior, com menores valores de Ψ_{pd} quando a quantidade de água fornecida ao solo foi menor (0,1 mm.dia⁻¹) (Figura 2A). Os menores valores de potencial hídrico máximo em plantas inoculadas foi de -0,55 e -0,87 MPa para o T1 e T2 respectivamente.

Para o potencial hídrico mínimo (Ψ_{md}) não se observou diferença entre os tempos nos diferentes regimes de irrigação. No entanto, houve diferença estatística entre tratamentos no T2. Em plantas inoculadas com *C. coffeicola* com regime de irrigação de 0,1 mm.dia⁻¹, observaram-se menores valores de potencial hídrico, chegando até -1,96 MPa (Figura 2B). Esses resultados indicam que a presença do fungo poderia acarretar um déficit hídrico acentuado a partir dos 18 DAI com irrigações abaixo de 0,1 mm.dia⁻¹, já que valores inferiores a -1,0 MPa são considerados prejudiciais ao cafeeiro, uma vez que causam redução da condutância estomática e, conseqüentemente, da fotossíntese líquida (LIMA et al., 2002). Em cafeeiros, a condutância estomática tem demonstrado uma diminuição linear com a diminuição do potencial hídrico foliar, sugerindo forte sensibilidade dos estômatos ao potencial hídrico (PINHEIRO et al., 2005).

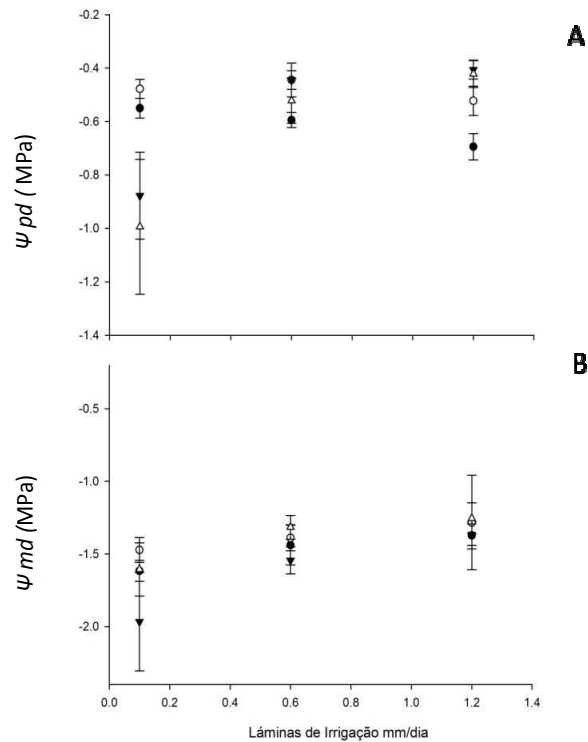


Figura 2. **A** Potencial hídrico máximo (Ψ_{pd}) e **B** Potencial hídrico mínimo (Ψ_{md}) de folhas de cafeeiro arábica submetidos a três lâminas de irrigação (1,2; 0,6 e 0,1 mm.dia⁻¹) inoculadas e não inoculadas com *Cercospora coffeicola*. Os pontos representam as médias e as barras o erro padrão (n = 18) . ● T1 INOC, ○ T1 nINOC, ▼ T2 INOC, △ T2 nINOC.

4.3 Trocas gasosas

Tanto em plantas inoculadas quanto não inoculadas para os tempos T1 e T2, os valores de A , g_s e E foram menores quanto menor a lâmina de irrigação aplicada (0,1 mm.dia⁻¹) ao longo do período experimental (Figuras 3 A, B e C). Esse comportamento é corroborado por LIMA et al. (2002), DIAS (2007), PRAXEDES et al. (2006) e DIAS et al. (2007) que encontraram redução

prolongada da fotossíntese líquida em plantas de café arábica sob condições de déficit hídrico.

Para os ambos os tempos (T1 e T2) em regime de irrigação de 0,6 mm.dia⁻¹ observaram-se maiores valores de A e g_s em plantas inoculadas quando comparadas com as não inoculadas. Entretanto, nesse regime de irrigação, os maiores valores foram para o T2 quando comparados com T1, demonstrando maior eficiência fotossintética e de condutância estomática nesse tempo (Figuras 3 A e B). Trabalhos realizados por SOUZA et al. (2011) indicam que o fungo *Cercospora* do gênero *coffeicola* tem a capacidade de penetrar através dos estômatos, e completar o período de incubação entre 19 e 21 dias após sua penetração, comprometendo assim o fluxo normal de trocas gasosas, pelo que esses valores apresentam relação direta com a capacidade de inoculação e colonização do fungo, dificultando a difusão de gases entre o interior da folha e o meio exterior.

Os valores médios de A , g_s e E em plantas não inoculadas foram maiores com o incremento da disponibilidade hídrica, ao contrário do observado em plantas inoculadas, em que esses comportamentos alcançaram valores máximos aos 0,6 mm.dia⁻¹ e se estabilizaram com qualquer incremento de irrigação.

Essa redução da taxa fotossintética também foi encontrada em outros patossistemas, assim AUCIQUE PEREZ et al. (2014) trabalhando com infecção de *Pyricularia oryzae* em plantas de trigo observou uma queda de 60% em A após cinco dias de inoculação, porém os trabalhos foram realizados em condições hidropônicas.

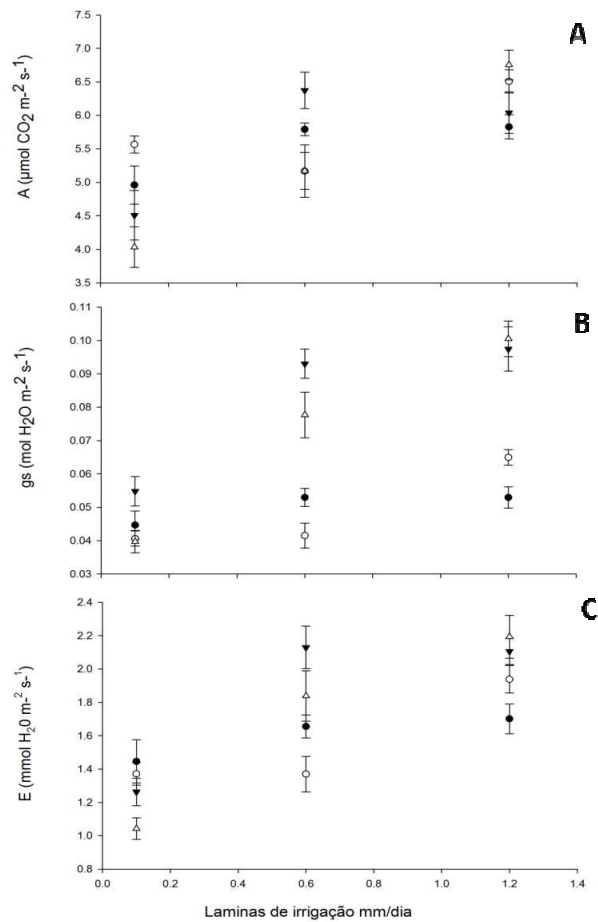


Figura 3. **A.** Fotossíntese líquida (*A*), **B.** Condutância estomática (*gs*), **C.** Transpiração (*E*) em folhas de café arábica submetidas a três lâminas de irrigação (1,2; 0,6 e 0,1 mm.dia⁻¹) e inoculadas e não inoculadas com *Cercospora coffeicola*. Os símbolos representam as médias e as barras o erro padrão (n=18) ● T1 INOC, ○ T1 nINOC, ▼ T2 INOC, △ T2 nINOC.

Com relação à eficiência de uso de recursos, observou-se que a presença do fungo infectando as folhas dos cafeeiros, somado a uma maior deficiência

hídrica, estaria provocando incremento na EUA, mas com valores inferiores quando comparadas com folhas não infectadas. O comportamento decrescente da EUA foi similar nas duas etapas avaliadas (T1 e T2) nas diferentes lâminas de irrigação em folhas inoculadas, mas apresentaram-se menores valores no T2 (Figura 4 A). Nesse período de tempo, a maior atividade colonizadora do fungo alterou a funcionalidade das células estomáticas, diminuindo as taxas fotossintéticas e provocando maior perda de água por *E*, o que pode ser atribuído provavelmente a presença do fungo, já que as condições hídricas ($1,2 \text{ mm.dia}^{-1}$) simulavam a capacidade de campo.

No caso da EUL, observou-se que plantas inoculadas apresentaram maior capacidade de conversão de fótons em compostos orgânicos em condições de irrigação de $0,6 \text{ mm.dia}^{-1}$, e com tendência a diminuição com o aumento ou redução da irrigação (Figura 4 B). Esse comportamento parece indicar que sob essas condições hídricas a planta maximiza a síntese de compostos defensivos durante o processo de infecção do fungo, permitindo manter o *estatus* fisiológico sem comprometer o normal desenvolvimento. Comportamento diferente foi observado nas plantas sem a presença do fungo, apresentando uma maior eficiência do uso da luz conforme a diminuição do déficit hídrico.

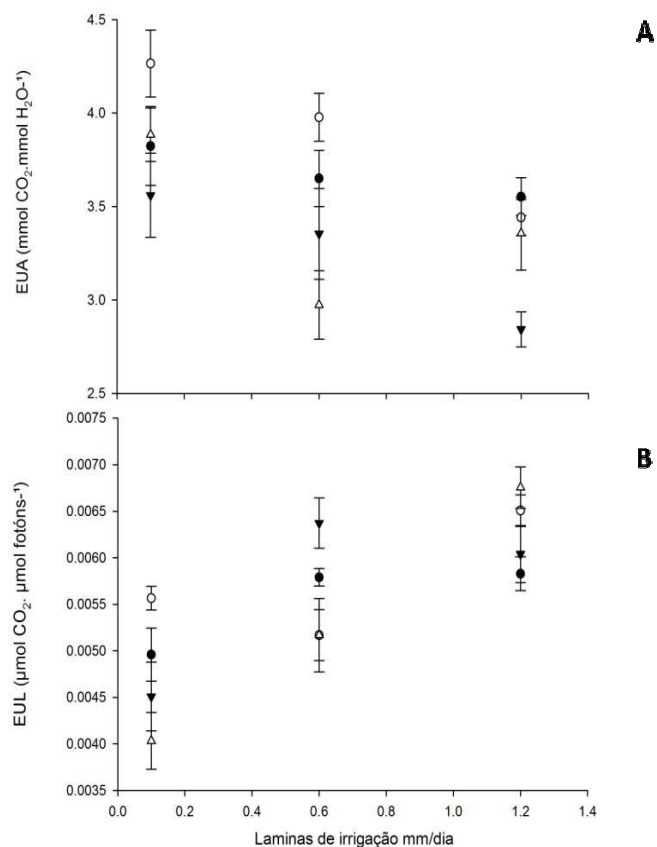


Figura 4. **A.** Eficiência de uso da água (EUA) e **B.** Eficiência de uso da luz (EUL) em folhas de café arábica submetidas a três lâminas de irrigação (1,2; 0,6 e 0,1 mm.dia⁻¹) e inoculadas e não inoculadas com *Cercospora coffeicola*. Os símbolos representam as médias e as barras o erro padrão (n=36), ● T1 INOC, ○ T1 nINOC, ▼ T2 INOC, △ T2 nINOC.

4. 4. Sistema Enzimático antioxidante

A atividade da SOD em plantas inoculadas apresentou maiores valores no T2 nos três regimes de irrigação quando comparada com as inoculadas no T1,

indicando que quanto mais avançou o processo de colonização do fungo, maior foi a degradação do peróxido de hidrogênio, produto do estresse provocado possivelmente pelo patógeno. Esse fato pode ser sustentado na evidência de que não houve diferença da atividade da enzima entre os regimes de irrigação. Comportamento similar foi observado na atividade da SOD em plantas não inoculadas no T2 quando comparadas com o T1, porém, com diferença estatística para o regime de irrigação de 0,6mm.dia⁻¹ (Figura 5 A).

No regime de irrigação 1,2 mm.dia⁻¹, apresentou-se maior atividade da SOD em plantas inoculadas no T2, evidenciando que o comportamento da enzima pode ser atribuído ao ataque direto do fungo ao tecido foliar. Entre as várias enzimas envolvidas na eliminação das ROS, a SOD pode ser considerada uma enzima chave, sendo geralmente a primeira linha de defesa ao estresse oxidativo (ASADA, 1999). Os resultados obtidos demonstraram que a presença do fungo induziu uma maior atividade da SOD quando em condições de maior disponibilidade hídrica. Sem presença de estresse biótico, DEUNER et al. (2011), observaram maior atividade da SOD, quando a água é o fator limitante da planta.

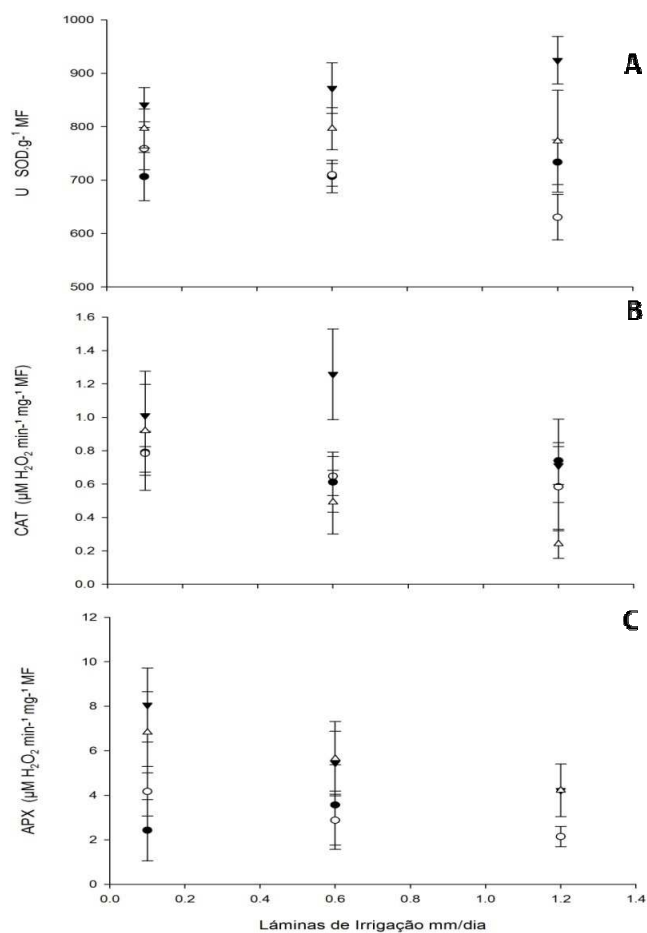


Figura 5. **A.** Atividade das enzimas Dismutase do Peróxido (SOD), **B.** Catalase (CAT) e **C.** Peróxido do Ascorbato (APX) em folhas de cafeeiro arábica submetidas a três lâminas de irrigação (1,2; 0,6 e 0,1 mm.dia⁻¹) e inoculadas e não inoculadas com *Cercospora coffeicola*. Os símbolos representam as médias e as barras o erro padrão (n=36). ●T1 INOC, ○ T1 nINOC, ▼ T2 INOC, △ T2 nINOC.

A CAT apresentou a maior atividade no T2 em plantas inoculadas para os regimes de irrigação 0,1 e 0,6 mm.dia⁻¹ (Figura 5 B). Os resultados obtidos demonstraram maior atividade da CAT quando a presença do fungo em menores volumes de água de irrigação, possivelmente pelo fato de ter uma maior formação de peróxido de hidrogênio derivados pela atividade da SOD ou induzidas possivelmente pelo fenômeno de fotorespiração.

A atividade da APX apresentou valores maiores em lâminas de irrigação inferiores a 1,2 mm.dia⁻¹, porém, em plantas inoculadas sempre manteve maior atividade no T2. Trabalhos realizados em girassol (BENAHMED et al 2009), andiroba, (COSTA et al, 2010), em café (DEUNER et al., 2011), oliveira (CARNEIRO, 2011), avaliando o estresse oxidativo ocasionado pela deficiência hídrica, e trabalhos realizados por SILVA (2013) testando deficiência nutricional em cafeeiros, demonstraram aumento na atividade das enzimas antioxidantes principalmente, SOD, CAT e APX, mostrando um eficiente sistema de defesa contra os danos celulares provocado pelo déficit hídrico. A capacidade de manter, em níveis elevados, a atividade da SOD, CAT e APX, em condições de estresse ambiental, é essencial para manter o equilíbrio entre a formação e remoção de H₂O₂ do ambiente intracelular (ZHANG; KIRKAM, 1996).

5. CONCLUSÕES

Mudas de café submetidas à interação de estresse biótico e abiótico podem originar valores de potencial hídrico inferiores a -1,9 MPa, provocando diminuição na condutância estomática, o que a sua vez limita a assimilação de carbono e causa queda nas taxas fotossintéticas. Há uma maior eficiência para o uso da água em plantas submetidas a condições de estresse, mas essa eficiência torna-se comprometida na presença de *C. Coffeicola* já que o cafeeiro aumenta a sua condutância estomática permitindo maiores perdas de água via transpiração. Esse aumento na g_s apresenta-se como uma estratégia para garantir maior eficiência na conversão de energia e suprir compostos essenciais ao sistema defensivo

A interação de *C. coffeicola* e deficiência hídrica provoca maior atividade do sistema enzimático antioxidativo, isso após 18 dias de inoculação. É necessária a realização de mais estudos desde o âmbito morfológico, anatômico e molecular que permitam corroborar esses comportamentos e definir estratégias de manejo, visando diminuir os efeitos negativos no processo de formação de mudas de cafeeiro.

6. BIBLIOGRAFIA

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, Jan. 2004.

ARRUDA, F. B.; GRANDE, M. A. Fator de resposta da produção do cafeeiro ao déficit hídrico em Campinas. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 139-145, 2003.

ARRUDA, R. **Café: variedades Mundo Novo e Catuaí marcam história cafeeira no país**. Campo Grande: Rural Centro, 2013. Disponível em: <<http://ruralcentro.uol.com.br/noticias/cafe-variedades-mundo-novo-e-catuai-marcam-historia-cafeeira-no-pais-63029#y=0>>.

AUCIQUE PEREZ, C. E. et al. Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence in wheat plants supplied with silicon and infected with *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 2, p. 143-149, Feb. 2014.

BENAHMED, C. H. et al. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 67, p. 345–352, Dec. 2009.

BREUSEGUEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Shannon, v. 161, p. 405-414, May 2001.

CANDAN, N.; TARHAN, L. Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg²⁺ deficiency in the *Mentha pulegium* leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 35-40, Jan. 2003.

CARNEIRO, M. M. L. C. **Trocas gasosas e metabolismo antioxidativo em plantas de girassol em resposta ao déficit hídrico**. 2011. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Instituto de Biologia; Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S.M. **Doenças do cafeeiro: diagnose e controle**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2000. 44p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 58).

CAVATTE, P. C. et al. Physiological responses of two coffee (*Coffeacanephora*) genotypes to soil water deficit. In: SANCHEZ, J. M (Ed.). **Droughts: causes, effects and predictions**. New York: Nova Science Publishers, 2008.

CHALFOUN, S. M. **Doenças do cafeeiro**: importância, identificação e métodos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 96 p.

CHAVES, A. R. M. et al. Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. **Trees**, Berlin, v. 22, n. 3, p.351-361, 2008.

COSTA, M. A. et al. Lipid peroxidation, chloroplastic pigments and antioxidant strategies in *Carapa guianensis* (Aubl.) subjected to water-deficit and short-term rewetting. **Trees**, Berlin, v. 24, p. 275–283, 2010.

DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.D.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1. p. 55-81, jan./mar. 2006.

DEUNER, S. et al. Stomatal behavior and components of the antioxidative system in coffee plants under water stress. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, n. 1, p. 77-85, jan./fev. 2011.

DIAS, P. C. et al. Morphological and physiological responses of two coffee progenies to soil water availability. **Plant Physiology**, Amsterdam, v. 164, n. 12, p. 1639-1647, Dec. 2007.

FERNANDEZ-BORRERO, O.; MESTRE, A. M.; DUQUE, S. L. Efecto de la fertilización en la incidencia de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola* en frutos de café. **Cenicafe**, v. 17, n. 1, p. 5-16, Ene-Mar, 1966.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GOMES, N. M.; LIMA, L. A.; CUSTÓDIO, A. de P. Crescimento vegetativo e produtividade do cafeeiro irrigado no Sul do Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.11, n. 6, p.564-570, nov./dez. 2007.

GRISI, F. A. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'catuaí' e 'siriema' submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, p.1730-1736, nov./dez. 2008.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Amsterdam, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experiment Station**, Gainesville, v. 347, n. 42, p. 1-32, 1950.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION – ICO. Country datasheets. Disponível em: <http://www.ico.org/profiles_e.asp>. Acesso em: 23 jan. 2014.

JIMENEZ, A. et al. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p. 1327-1335, Dec. 1998

JONES, H. G. **Plants and Microclimate**: a quantitative approach to environmental plant physiology. 2 ed. Cambridge: Cambridge University, 1992. 85p.

LIMA, A. L. S. et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffeacanephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Rockville, v. 47, n. 3, p. 239-247, May 2002.

MARTINEZ, C. A. et al. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanumcurtilobum* and freezing sensitive *Solanumtuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 3, p. 505-515, 2001.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

PASCHOLATI S.F. **Interacao planta patogeno**: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. 627p.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffeacanephora*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 101-108, July 2005.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injurias causados por doenças em cafeeiro. In: GUIMARAES, R. L.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro**: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitários e fisiológicos. Lavras: UFLA, 2010. p. 69-101.

PRAXEDES, S. C. et al. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. **Environmental and Experimental Botany** Rockville, v. 56, n. 3, 263-273, July 2006.

QUILES, M. J.; LÓPEZ, N. I. Photoinhibition of photosystems I and II induced by exposure to high light intensity during oat plant grown effects on the chloroplastic NADH dehydrogenase complex. **Plant Science**, Shannon, v. 166, n. 3, p. 815-823, Mar. 2004.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J.; Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu Rev. Plant Biol* 57. 675-709.

SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Melhoramento de café arábica. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 189-204.

SHARKEY, T. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. **Plant Cell Environment**, Hoboken, v.28, n. 3, p. 269-277, Mar. 2005.

SILVA, M. D. **Deficiência de Magnésio na fisiologia e metabolismo antioxidante de cultivares de cafeeiro**. 2013. 58p. Dissertação (Mestrado em fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SIMS, D.A.; GAMON, J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, n. 2-3, p. 337-354, Aug. 2002.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 1, p. 6-11, June 2011.

ZHANG, J.; KIRKAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v.149, n.5, p. 498-493, 1996.