



MARIANA THEREZA RODRIGUES VIANA

**CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E DE
CRESCIMENTO EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM
Hemileia vastatrix Berk & Br. EM CAFEIEIRO**

**LAVRAS - MG
2018**

MARIANA THEREZA RODRIGUES VIANA

**CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E DE CRESCIMENTO EM
RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Hemileia vastatrix* Berk & Br. EM CAFEIEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Rubens José Guimarães
Orientador
Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Viana, Mariana Thereza Rodrigues.

Características morfofisiológicas e de crescimento em resposta
à inoculação com *Hemileia vastatrix* Berk & Br. em cafeeiro /
Mariana Thereza Rodrigues Viana. - 2018.

100 p.

Orientador(a): Rubens José Guimarães.

.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.
Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Ferrugem do café. 3. Mecanismos de
resistência. I. Guimarães, Rubens José. II. Título.

MARIANA THEREZA RODRIGUES VIANA

**CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E DE CRESCIMENTO EM
RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Hemileia vastatrix* Berk & Br. EM CAFEIEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 19 de novembro de 2018.

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho	EMBRAPA
Dr. César Elias Botelho	EPAMIG
Dr. Rodrigo Luz da Cunha	EPAMIG
Dra. Danielle Pereira Baliza	IF Sudeste MG

Prof. Dr. Rubens José Guimarães
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

*Aos meus pais, Eleuza e Mário, pelo amor incondicional e por acreditarem sempre em mim.
Aos meus irmãos, Mário e Pedro, pela amizade e carinho.
A minha avó Cleuza, pelas orações.
Ao meu namorado, Frederico, pela paciência e companheirismo.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Santa Terezinha, por guiarem minhas decisões e colocarem em meu caminho sempre pessoas especiais.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), à Pró-Reitoria de Pós-Graduação e ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e seus docentes, que abriram caminho para a minha realização profissional.

Ao meu orientador, professor Rubens José Guimarães, pela orientação e ensinamentos, sendo base para que eu persistisse em meus objetivos diante das dificuldades enfrentadas, tornando-se um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido.

À minha coorientadora, Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho, pelas orientações, ensinamentos, conselhos e paciência.

Ao professor Samuel Pereira de Carvalho, pela confiança em meu trabalho junto ao Núcleo de Estudos em Melhoramento e Clonagem (NEMEC).

Ao Núcleo de Estudos em Melhoramento e Clonagem (NEMEC), por todo o aprendizado compartilhado, em especial a Joyce pela ajuda.

À Dra. Fernanda Aparecida Castro Pereira e Dra. Janine Magalhães Guedes, que me orientaram e auxiliaram em todas as etapas do projeto.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária em Minas Gerais (EPAMIG), por disponibilizar materiais para a realização deste trabalho.

Ao pesquisador da Epamig Antonio Alves Pereira (Tônico), que idealizou o Banco de Germoplasma de Minas Gerais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Aidê e a Adriana, por todos os cuidados dedicados a mim.

Ao Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, em especial professor Mário Lúcio, Joyce e Manoel, pelo auxílio na condução do trabalho e uso do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia e Fisiologia do Café, pelo auxílio na condução do trabalho, em especial Harianna, Cyntia e Otávio.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras e à Fapemig, pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

Às secretárias Marli, da Pós-graduação e Débora, da InovaCafé, pelo auxílio e apoio sempre.

À InovaCafé e seus funcionários, em especial seu Zé Maurício, Alexandre e Felipe, pela ajuda e ensinamentos no experimento em casa de vegetação.

Aos membros da banca de defesa, Dra. Danielle, Dra. Milene, Dr. César e Dr. Rodrigo, pela disponibilidade e contribuição ao trabalho.

Aos meus familiares, em especial meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir o caminho que eu escolhi.

Ao meu tio Wellington por me passar um pouco da sua paixão por agricultura durante meu curso.

Aos colegas do Departamento de Agricultura e da InovaCafé, pela convivência.

Às minhas amigas de Itajubá e Viçosa, por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus amigos queridos de Lavras, Harianna, Nicole, Isadora, Luiza, Ana, Nagla, Bárbara, Rayane e Guilherme, que sempre me apoiaram e deixaram meus dias de lazer e trabalho mais felizes.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Obrigada por fazerem parte desse momento tão especial!

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos. (Fernando Pessoa)

RESUMO GERAL

A ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é a principal doença fúngica que afeta as lavouras cafeeiras. Tem-se buscado obter mecanismos de resistência à doença, visto que o fungo apresenta alta variabilidade genética e seu controle mais eficiente e sustentável é por meio da utilização de cultivares resistentes. Objetivou-se, neste trabalho, identificar características morfofisiológicas e de crescimento de genótipos de café em resposta à inoculação com o fungo *Hemileia vastatrix*. Foram selecionados 10 genótipos de cafeeiros do Banco Ativo de Germoplasma de Minas Gerais e plantados em casa de vegetação. As mudas foram inoculadas com o fungo *Hemileia vastatrix*. Foram avaliadas características fisiológicas, anatômicas e de crescimento, antes e após a inoculação. Foram realizadas avaliações de incidência e severidade da doença. Os genótipos se comportaram de maneira diferente para as respostas fisiológicas, ao longo dos tempos de avaliação. O genótipo que apresentou maior incidência e severidade de ferrugem foi Topázio MG 1190, confirmando sua suscetibilidade, seguido de MG 0582 e Catiguá MG 3. Menores valores de fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração foliar e eficiência de carboxilação ocorreram em genótipos com maior incidência de doença. Os teores de clorofila não foram alterados com a incidência da ferrugem. Os genótipos se agruparam de forma diferente, tanto para características anatômicas quanto para fisiológicas, antes e após a inoculação, o que sugere diferentes adaptações dos genótipos estudados frente ao estresse causado. Além disso, foram identificados grupos de características correlacionadas envolvendo características morfofisiológicas e de crescimento. Menor espessura da cutícula da face abaxial, menor diâmetro de vasos do xilema, menor eficiência instantânea do uso da água, maior número e densidade de estômatos e maior condutância estomática proporcionaram maior severidade da doença. Menor espessura do parênquima paliçádico e menor razão entre espessura do parênquima paliçádico e parênquima esponjoso podem ocorrer em cafeeiros que apresentem maior severidade da doença, em função da inoculação com o patógeno. De acordo com os resultados observados, características morfofisiológicas e de crescimento podem ser promissoras para a utilização em seleção assistida pelos programas de melhoramento genético convencional e biotecnológico do cafeeiro no desenvolvimento de cultivares resistentes à ferrugem.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Ferrugem do café. Mecanismos de resistência. Estresse biótico.

GENERAL ABSTRACT

The rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix* is the main fungal disease that affects the coffee crops. Resistance mechanisms to disease have been sought, since the fungus presents high genetic variability and its most efficient and sustainable control is through the use of resistant cultivars. This work aim was to identify the coffee genotypes morphophysiological and growth characteristics in response to inoculation with the fungus *Hemileia vastatrix*. Ten coffee trees genotypes were selected from the Germoplasma Active Bank of Minas Gerais and planted in a greenhouse. The seedlings were inoculated with the fungus *Hemileia vastatrix*. Physiological, anatomical and growth characteristics were evaluated before and after inoculation. Incidence evaluations and severity of the disease were carried out. Genotypes behaved differently for physiological responses over time of evaluation. The genotype that presented the highest incidence and severity of rust was Topazio MG 1190, confirming its susceptibility, followed by MG 0582 and Catiguá MG 3. Lower values of liquid photosynthesis, stomatal conductance, leaf transpiration and carboxylation efficiency occurred in genotypes with higher incidence of disease. Chlorophyll contents were not altered with the incidence of rust. The genotypes were grouped differently for both anatomical and physiological characteristics, before and after inoculation, suggesting different adaptations of the studied genotypes to the stress caused. Besides that, groups of correlated characteristics involving morphophysiological and growth characteristics were identified. Lower abaxial face cuticle thickness, smaller xylem vessel diameter, less instantaneous water use efficiency, greater number and density of stomata and greater stomatal conductance provided greater severity of the disease. Lower thickness of palisade parenchyma and lower ratio between thickness of the palisade parenchyma and spongy parenchyma may occur in coffee trees that present a greater severity of the disease, depending on the inoculation with the pathogen. According to the observed results, morphophysiological and growth characteristics may be promising for use in selection assisted by conventional and biotechnological breeding programs of coffee in the development of rust cultivars resistant.

Keywords: *Coffea arabica*. Coffee rust. Resistance mechanisms. Biotic stress.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
	REFERÊNCIAS	21
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	25
	ARTIGO 1 Trocas gasosas e índice de clorofila de genótipos de café infectados por <i>Hemileia vastatrix</i>	25
1	INTRODUÇÃO	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	28
3	RESULTADOS	33
3	DISCUSSÃO	40
4	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	46
	ARTIGO 2 Análise multivariada das adaptações morfofisiológicas causadas por estresse biótico em genótipos cafeeiros	50
1	INTRODUÇÃO	52
2	MATERIAL E MÉTODOS	54
3	RESULTADOS	60
4	DISCUSSÃO	68
5	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	ARTIGO 3 Rede de correlações entre características morfofisiológicas e de crescimento de genótipos de cafeeiros inoculados com <i>Hemileia vastatrix</i>	77
1	INTRODUÇÃO	79
2	MATERIAL E MÉTODOS	81
3	RESULTADOS	87
4	DISCUSSÃO	91
5	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	95
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de café do mundo, sendo as espécies de cafeeiro *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* P. as que apresentam maior importância econômica. Entretanto, uma das principais causas da queda de produtividade das lavouras cafeeiras é a ferrugem alaranjada, que tem como agente causal o fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., uma doença foliar causada por um fungo biotrófico. Em regiões cafeeiras onde as condições climáticas são favoráveis à doença, estima-se que as perdas na produção provocadas pela ferrugem variem de 35% a 50% (ZAMBOLIM, 2016).

O manejo integrado da ferrugem do cafeeiro, que inclui métodos como o controle químico, genético e cultural, pode ser adotado para controlar a doença e diminuir o uso de produtos químicos. Contudo, até mesmo em lavouras nas quais o manejo integrado adequado vem sendo empregado, a doença tem ocorrido, exigindo cada vez mais aplicações de fungicidas. Uma alternativa para reduzir a quantidade de fungicidas aplicados na lavoura tem sido a utilização de cultivares resistentes, porém, essa resistência tem sido quebrada ao longo do tempo, possivelmente devido ao surgimento de novas raças fisiológicas do fungo.

Objetivando mitigar o uso de defensivos no controle de patógenos e diminuir as perdas de produção ocasionadas pela doença, os programas de melhoramento genético de cafeeiro do mundo todo têm buscado obter resistência duradoura à ferrugem. Diante disso, trabalhos vêm sendo realizados no intuito de selecionar materiais genéticos mais resistentes à doença. Nesse contexto, acredita-se que materiais que apresentam características morfofisiológicas de resistência à ferrugem poderão ser utilizados na pré-seleção de materiais de interesse.

O ataque de patógenos na planta ocasiona diversas alterações fisiológicas e estruturais no hospedeiro (ALVES et al., 2011; STANGARLIN et al., 2011). Dentre os processos fisiológicos relevantes, a fotossíntese, a condutância estomática e a transpiração são os mais afetados (DEBONA et al., 2014; GORTARI et al., 2017; JIANG et al., 2016). Além disso, como a superfície das plantas constitui a primeira linha de defesa contra fitopatógenos (PASCHOLATI, 2011), e o fungo da ferrugem penetra na folha de café por meio dos estômatos, torna-se necessário o conhecimento dos mecanismos estruturais e fisiológicos das plantas na interação patógeno-hospedeiro.

Diante disso, objetivou-se identificar os mecanismos de resistência de diferentes genótipos de cafeeiros com base em características morfofisiológicas e de crescimento em

resposta à inoculação com o fungo *Hemileia vastatrix*, a fim de utilizar essas características, em conjunto com o melhoramento genético convencional do cafeeiro, no desenvolvimento de cultivares resistentes à ferrugem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica do café

A cafeicultura é uma das atividades socioeconômicas de maior importância no agronegócio mundial, tendo o Brasil como o maior produtor e exportador e o segundo maior consumidor. As espécies de café comerciais cultivadas são a *Coffea canephora* P. e a *Coffea arabica* L., originárias das florestas tropicais da Etiópia e do oeste da África, que representam cerca de 60% e 40% do mercado mundial de café, respectivamente (VOSSEN; BERTRAND; CHARRIER; 2015).

A estimativa para a safra brasileira, em 2018, é de 59,9 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiadas, com um crescimento de 33,2% em relação à safra anterior. A produção de café arábica foi estimada em 45,94 milhões de sacas, o que corresponde a 76,7% do volume total de café produzido no país, e o estado de Minas Gerais, principal produtor de arábica, com produção de 31,55 milhões de sacas. A produção de *Coffea canephora* foi estimada em 13,97 milhões de sacas, o que representa 23,3% do total da produção brasileira, sendo o estado do Espírito Santo o maior produtor desta espécie, com produção de 8,8 milhões de sacas (CONAB, 2018).

Segundo dados da Organização Internacional do Café (ICO, 2018), houve uma estimativa de crescimento de produção de 33,2% em relação ao ano anterior, porém, ocorreu queda de 6,6% na produção de café arábica 2017/2018 e aumento de 11,5% na produção do café robusta. O aumento de produção total se deu, principalmente, devido às condições climáticas favoráveis em boa parte do desenvolvimento da cultura. Outros fatores, como melhores condições de manejo, material genético mais produtivo, além de pacote tecnológico mais avançado, também contribuíram para este aumento (CONAB, 2018).

2.2 Aspectos gerais do fungo *Hemileia vastatrix*

O fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., causador da ferrugem do café, pertence ao gênero *Hemileia*, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales (fungos da ferrugem). Foi descrito no Ceilão (Sri Lanka), em 1868, por Berkeley e Broome e Ward, o que deu origem ao seu nome (TALHINHAS et al., 2016). No Brasil, ela foi encontrada pela primeira vez em *Coffea arabica* em 1970, na Bahia, e levou menos de dois anos para espalhar pelas principais regiões produtoras

de café, se tornando, hoje, a principal doença do cafeeiro (BEDENDO, 2011; ZAMBOLIM, 2016)

O gênero *Hemileia* distingue-se de outros gêneros de ferrugem pela combinação de três características morfológicas que são o hábito de esporulação por meio de estômatos, o modo de penetração e os esporos pedicelados e reunidos em feixes e uredósporos reniformes, equinados dorsalmente e lisos ventralmente (RIJO; RODRIGUES, 1978).

A ferrugem do cafeeiro é uma doença foliar, causada por um fungo biotrófico. Inicialmente, provoca manchas cloróticas translúcidas de 1-3 mm de diâmetro, observadas na face inferior do limbo foliar. Posteriormente, desenvolvem-se massas pulverulentas de coloração amarelo-laranja, formadas por uredósporos do patógeno, chamadas de pústulas. Cada pústula produz, em média, 150.000 uredósporos, que podem sobreviver sob condições de seca por um período de até seis semanas. Ocasionalmente, o fungo pode afetar também a extremidade do ramo em desenvolvimento e frutos verdes, podendo causar a queda precoce de folhas e a seca de ramos (ZAMBOLIM et al., 2002; SILVA et al., 2006).

A disseminação ocorre pela ação do vento, pelas gotas de chuva, pelo homem e por insetos e outros animais que entrem em contato com plantas infectadas, sendo a água o mais eficiente agente de disseminação a curtas distâncias (BEDENDO, 2011). Depois de disseminados, os uredósporos que caírem na face inferior das folhas germinarão em um período de 3 a 6 horas, em condições de muita umidade ou água livre e temperatura entre 21 e 25 °C, na ausência de luz (RIJO; RODRIGUES, 1978). Após a formação de apressórios, o fungo penetra no hospedeiro por meio dos estômatos, formando hifas que crescem na câmara subestomática, colonizando tecidos como parênquimas, podendo chegar até a epiderme da face adaxial (TALHINHAS et al., 2016). Aproximadamente três semanas após a infecção, os soros uredospóricos se projetam pelos estômatos em forma de “bouquet”, que aparecem como pústulas de cor laranja, sendo o sinal típico dessa doença (RIJO; RODRIGUES, 1978; SILVA et al., 2006).

Folhas em qualquer fase de desenvolvimento são suscetíveis ao fungo. Entretanto, a penetração e a colonização são mais rápidas e frequentes em folhas jovens. Em folhas completamente desenvolvidas, a colonização é dificultada pelas características dos tecidos do limbo foliar (BEDENDO, 2011).

No Brasil, o progresso temporal da ferrugem na maioria das regiões de cultivo de café durante anos de safra alta tem início em dezembro/janeiro e aumenta exponencialmente durante março-maio, com picos em junho-julho (dependendo da altitude) (ZAMBOLIM, 2016). Após a colheita, a intensidade da doença diminui devido às baixas temperaturas e à queda das folhas.

Em anos de alto rendimento, a incidência da ferrugem pode chegar a 90% em variedades suscetíveis sob clima favorável (ZAMBOLIM, 2016).

As perdas na produção provocada pela ferrugem variam de 35% a 50%, dependendo de fatores como suscetibilidade da cultivar, umidade do ambiente, carga pendente e estado nutricional da planta (ZAMBOLIM et al., 2005). As desfolhas dos cafeeiros provocadas pela ferrugem que ocorrem antes da indução floral ou durante o desenvolvimento dos frutos, respectivamente, ocasionam a redução da floração e a malformação dos grãos (BEDENDO, 2011).

O manejo integrado da ferrugem do cafeeiro, que inclui métodos como o controle químico, genético e cultural, pode ser adotado para o controle da doença. Entretanto, mesmo em lavouras nas quais o manejo integrado adequado vem sendo empregado, a doença tem ocorrido, exigindo cada vez mais aplicações de fungicidas. O uso de defensivos é bastante efetivo para o controle da doença, todavia, existem considerações sobre a utilização de fungicidas na agricultura os quais, além de aumentarem o custo de produção e serem prejudiciais ao ambiente, podem levar ao surgimento de novas raças do patógeno (PAULO; MONTES; FISCHER, 2013). Embora existam cultivares resistentes à ferrugem, essa resistência tem sido facilmente quebrada em razão do surgimento de novas raças fisiológicas do patógeno (CABRAL et al., 2009).

Devido aos prejuízos ocasionados pela doença e aos danos ocasionados pela aplicação de fungicidas, os programas de melhoramento genético do mundo todo têm buscado obter resistência duradoura à ferrugem do cafeeiro. No entanto, a variabilidade do patógeno e o surgimento de novas raças, bem como a ocorrência de um complexo de raças, ilustram o potencial evolutivo das populações de *Hemileia vastatrix* e sua consequente adaptação para a implantação generalizada de genes de resistência (VARZEA; MARQUES, 2005; CABRAL et al. 2009; ZAMBOLIM, 2016).

2.3 Melhoramento genético do café visando resistência à ferrugem

Os avanços obtidos pelos programas de melhoramento genético do cafeeiro têm colocado à disposição dos produtores um grande número de cultivares adaptadas às várias regiões do país. Essas cultivares apresentam importantes características que foram incorporadas pelo processo de melhoramento, como produtividade elevada, maturação uniforme, tolerância à geada e à seca, porte baixo e formato de copa adequado para colheita mecanizada, arquitetura

adequada para adensamento, elevado tamanho de grão e qualidade de bebida, e resistência ou tolerância às principais pragas e doenças da cultura (CARVALHO et al., 2008).

Os primeiros trabalhos de melhoramento genético do cafeeiro foram realizados em 1932 e, até a década de 1960, os objetivos eram direcionados ao desenvolvimento de cultivares mais produtivas, vigorosas e adaptadas às diferentes regiões do país (CARVALHO et al., 2008). Após 1970, com o aparecimento da ferrugem do cafeeiro e sua rápida disseminação nas lavouras brasileiras, a resistência à ferrugem passou a ser um dos principais focos dos programas de melhoramento dessa espécie (MCCOOK, 2008) e, juntamente com o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), novos programas de melhoramento foram iniciados em diversas instituições, como, por exemplo, a Universidade Federal de Lavras (UFLA), a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), entre outras (PEREIRA et al., 2010). No entanto, a obtenção de cultivares resistentes tem sido um constante desafio para os programas de melhoramento, devido à variabilidade genética do fungo e à quebra de resistência, fazendo com que, ao longo do tempo, as plantas se tornem suscetíveis a novas raças do patógeno (SERA et al., 2010; VARZEA; MARQUES, 2005).

A variabilidade de *H. vastatrix* é determinada pelo seu padrão de infecção em uma série de cafés considerados espécies diferenciadoras (VARZEA; MARQUES, 2005). Isso é possível devido à interação entre o cafeeiro e o fungo ocorrer de acordo com a teoria gene-a-gene, proposta por Flor (1971), em que ocorre o reconhecimento dos genes de avirulência das diferentes raças fisiológicas do fungo por parte dos fatores de resistência do cafeeiro (BETTENCOURT; RODRIGUES, 1988). Até o momento, já foram identificadas mais de 50 raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* e, no Brasil, foram identificadas 15 delas, sendo as raças I, II, III e XV as mais importantes (ZAMBOLIM, 2016). Em cafeeiro, nove genes conferem resistência a diversas raças de *H. vastatrix*, sendo estes genes dominantes/recessivos (SH1, SH2, SH3, SH4, SH5, SH6, SH7, SH8 e SH9) e aparentemente independentes (BETTENCOURT; RODRIGUES, 1988).

Do ponto de vista genético, a resistência pode ser oligogênica (genes qualitativos) ou poligênica (genes quantitativos). Em termos fenotípicos, ela pode ser completa ou incompleta (total ou parcial). No sentido de durabilidade, a resistência pode ser temporária ou durável. No que se refere às relações patógeno-hospedeiro, ela pode ser definida como específica ou não específica, diferencial ou uniforme, e vertical ou horizontal (FAZUOLI, et al, 2007). A resistência vertical é caracterizada, principalmente, pela presença da interação diferencial entre o hospedeiro e o patógeno, e a resistência horizontal, pela ausência dessa interação, sendo que

a resistência vertical oferece resistência completa contra a doença, mas não é durável. Por outro lado, a resistência horizontal condiciona proteção incompleta e é durável (CAPUCHO, et al., 2009; FAZUOLI et al., 2007).

O Híbrido de Timor e as progênes derivadas do seu cruzamento com outras cultivares vêm sendo estudados, em diversas regiões cafeeiras do mundo, como a principal fonte de resistência a *H. vastatrix* (VÁRZEA e MARQUES, 2005; CAPUCHO et al., 2009). Ele, provavelmente, é um híbrido natural entre *Coffea arabica* e *C. canephora* (PATRÍCIO; BRAGHINI; FAZUOLI, 2010). Esse germoplasma tem sido valioso para os programas de melhoramento visando à obtenção de resistência durável à ferrugem, além de apresentar resistência a outras doenças e pragas do cafeeiro (CAPUCHO et al., 2009). Já os acessos Dilla & Alghe foram introduzidos da Etiópia e são caracterizados por apresentarem resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (agente causal da mancha areolada) e a algumas raças de *Hemileia vastatrix* (MORAES et al., 1974; PETEK et al., 2006).

A cultivar Catiguá MG 3 é resultante da hibridação artificial entre ‘Catuaí Amarelo IAC 86’ (UFV 2154-344 EL7) e uma planta da seleção de Híbrido de Timor UFV 440-10. Esta cultivar apresenta resistência às principais raças de *Hemileia vastatrix* e ao nematoide das galhas da espécie *Meloidogyne exigua* (EPAMIG, 2004). Já a cultivar Topázio MG 1190, oriunda do cruzamento entre as cultivares Catuaí Amarelo e Mundo Novo, tem excelente produtividade e elevado vigor vegetativo, porém, é suscetível à ferrugem (CARVALHO et al., 2008).

2.4 Modificações em plantas em função do estresse biótico

As plantas evoluíram para viver em ambientes nos quais são frequentemente expostas a diferentes fatores de estresse bióticos e abióticos. Sendo sésseis, desenvolveram mecanismos específicos que permitem detectar mudanças ambientais precisas e responder a condições complexas de estresse, minimizando os danos e conservando recursos essenciais para seu crescimento e reprodução (ATKINSON; URWIN, 2012). Dessa forma, as plantas são capazes de se defenderem do ataque de patógenos de maneira efetiva, dada a multiplicidade e a eficiência desses mecanismos, já que, na natureza, a resistência é uma regra e a suscetibilidade uma exceção (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI et al., 2011).

Os mecanismos de defesa de uma planta à penetração do patógeno podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados. Os mecanismos estruturais constituem barreiras físicas à penetração e/ou à colonização do patógeno, enquanto os mecanismos bioquímicos

englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; STANGARLIN et al., 2011).

Os mecanismos estruturais de resistência podem ser constitutivos, também denominados pré-formados, ou induzidos, também denominados pós-formados. Os pré-formados são as estruturas produzidas pela planta, independente da ação de patógenos, tendo diversas funções na planta além da resistência, como, por exemplo, a cutícula, epiderme, forma e número de estômatos, pilosidade, vasos condutores de seiva e tecido parenquimático. Os mecanismos pós-formados de resistência são expressos após o início das atividades do patógeno na superfície do hospedeiro, como a formação de halos, papilas ou lignificação, que são barreiras celulares ou camadas de cortiça, camadas de abscisão, tilose e deposição de gel (STANGARLIN et al., 2011; SILVA; ALQUINI; CAVALLET, 2005).

O grau de envolvimento dos fatores estruturais e bioquímicos nas respostas de resistência da planta varia de acordo com o patossistema, a idade da planta hospedeira, o órgão e/ou tecido afetado, o estado nutricional e as condições ambientais (JOHAL et al., 1995; STANGARLIN et al., 2011).

A superfície das plantas constitui a primeira linha de defesa contra fitopatógenos, que devem ultrapassá-la para iniciar a infecção (PASCHOLATI, 2011; XU et al., 2011). Dessa forma, o estudo das características estruturais das plantas em relação à patogênese é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos de resistência desenvolvidos em diversos patossistemas (MUSSURY et al., 2012).

Características estruturais, como as descritas por Silva; Alquini e Cavallet (2005), como cutícula mais espessa, estômatos que se abrem tardiamente durante o dia, tecidos lignificados, compactação e espessura do parênquima, são consideradas úteis para a identificação de genótipos resistentes aos patógenos. A quantificação e a localização dos estômatos, tricomas e epiderme também são importantes na verificação da relação entre a disposição dessas estruturas e a incidência e severidade de doenças (LOURENÇO et al., 2011).

Os estômatos têm papel fundamental nos processos fisiológicos das plantas, porém, eles também proporcionam abertura natural para a entrada de alguns agentes patogênicos no interior dos tecidos das folhas (VILLAVERDE et al., 2011; MELOTTO; UNDERWOOD; HE, 2008). Por meio dos estômatos, o fungo *Hemileia vastatrix* penetra na face abaxial das folhas de café, com o auxílio de uma hifa de penetração, produzindo haustórios nas células subsidiárias ou estomáticas adjacentes, para posterior colonização do mesofilo (RAMIRO et al., 2009). Espécies de café resistentes e suscetíveis apresentam diferentes características estomáticas,

embora o índice estomático e o número de células epidérmicas não tenham sido correlacionados com os níveis de resistência das plantas (ACUÑA; ACUÑA; ZAMBOLIM, 1998). Maiores índices estomáticos, densidades estomáticas e quantidade de tricomas foram observados em genótipos de amora resistentes/tolerantes ao fungo biotrófico *Phyllactinia corylea* (CHATTOPADHYAY et al., 2011).

A cutícula que reveste o tecido de revestimento da epiderme, além de regular a entrada e saída de água, funciona como uma barreira eficiente contra a entrada da maioria dos patógenos que colonizam a superfície (STANGARLIN et al., 2011). Dependendo da espessura, da densidade e dos compostos presentes na cutícula, as plantas podem ser mais ou menos resistentes (PANTILU et al., 2012). Mutantes de plantas de tomate com a cutícula mais densa e espessa tornaram-se resistentes a *Botritis cinerea* (REINA-PINTO; YEPHREMOV, 2009). A espessura da cutícula das folhas de feijão está relacionada com a resistência ao fungo da antracnose, *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* (JERBA; RODELLA; FURTADO, 2005).

Os tecidos parenquimáticos, relacionados com a capacidade fotossintética das plantas, podem exibir resistência aos patógenos, mesmo sem apresentar lignificação (SILVA; ALQUINI; CAVALETTI, 2005). O arranjo solto de células do tecido paliçádico, juntamente com aumento de espaços intercelulares do parênquima esponjoso em genótipos de amendoim, resultou em aumento da progressão e da ramificação fúngica da mancha foliar (*Phaeoisariopsis personata*) nas folhas dos genótipos suscetíveis (TRIVEDI et al., 2014). Cultivares da mesma espécie podem apresentar densidade, compactação, espessura da parede das células do parênquima paliçádico e proporção e parênquima paliçádico diferenciados, resultando em diferenças quanto à resistência aos microrganismos (MAHAJAN; DHILLON; BHARDWAJ, 2017).

Os vasos condutores, além de funcionarem conduzindo fluxo de seiva, têm a função estrutural para sustentação da parte aérea (STANGARLIN et al., 2011). A cultivar de feijoeiro Iapar-81 apresenta resistência a *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* correlacionada à menor saliência dos vasos, interferindo na orientação tigmotrópica na fase de pré-penetração, dificultando a entrada do patógeno (JERBA; RODELLA; FURTADO, 2005). As modificações ocasionadas por patógenos nos vasos condutores das plantas podem afetar negativamente a produção de biomassa, a sobrevivência e o rendimento das plantas (AGARWAL et al., 2006).

O estresse biótico pode causar danos às células do mesófilo, às membranas, ao funcionamento da maquinaria enzimática e na abertura e no fechamento dos estômatos, afetando não só características estruturais, mas também mecanismos fisiológicos, como a taxa fotossintética, a transpiração e o influxo do CO₂ (BERGER, et al., 2007). Dessa forma, os

estudos das trocas gasosas e dos índices de clorofilas têm sido considerados indicadores úteis das atividades fotossintéticas das plantas sob condições de estresse biótico (DEBONA et al., 2014; CURVELO et al., 2013; GORTARI et al., 2017).

Entre os processos fisiológicos relevantes, a fotossíntese é o principal processo afetado pelos patógenos (ALVES et al., 2011; XAVIER et al., 2015; BERGER et al., 2007). A alteração na taxa fotossintética líquida das plantas pode ser devido à quantidade dos pigmentos de clorofila ou à condutância estomática (CARRETERO; BANCAL; MIRALLES, 2011). Por ser biotrófico, o fungo da ferrugem coloniza apenas tecidos vivos e, dessa forma, sugere-se que esse fungo possa causar danos substanciais modificando a fisiologia do hospedeiro, seja diretamente, via secreção de produtos químicos, ou indiretamente, por meio de respostas induzidas (ALVES et al., 2011; DEBONA et al., 2014).

O conhecimento da maneira pela qual um fitopatógeno altera os mecanismos estruturais e fisiológicos e o crescimento da planta hospedeira pode, ao mesmo tempo, auxiliar no estabelecimento das bases de controle ou manejo das doenças e permitir a supressão ou a diminuição dos danos causados às culturas (BASSO et al., 2010; XU et al., 2011).

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, R.S.; ACUÑA, A.S.; ZAMBOLIM, L. Índice estomático en materiales genéticos de café resistentes o susceptibles a la roya. **Bioagro**, Viçosa, v.10, n.2, p.57-61, 1998.
- AGARWAL P.K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants, **Plant Cell**, v. 25, p. 1263–1274, 2006.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 5th ed. p.922, 2005.
- ALVES, A. A. et al. Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. **Acta Physiol. Plant**, v.33, p. 1831-1839, 2011.
- ATKINSON, N.J, URWIN, P.E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p. 3523–3543, 2012.
- BASSO, M.F. et al. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n.6, p.351-359, 2010.
- BEDENDO, I. Ferrugens. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, p.479-484, 2011.
- BERGER, S. et al. Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A.thaliana*. **J Exp Bot**, v.58, p.797–806, 2007.
- BETTENCOURT, A.J., RODRIGUES, C.J. **Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases**. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. eds. *Coffee: Agronomy*. London: Elsevier Applied Science p 285-292, 1988.
- CABRAL, P.G.et al. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease**, v.4, p.129-130, 2009.
- CAPUCHO, A.S. et al. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 276-282, Mar. 2009 .
- CARRETERO, R.; BANCAL, M.O; MIRALLES, D. J. Effect of leaf rust (*Puccinia triticina*) on photosynthesis and related processes of leaves in wheat crops grown at two contrasting sites and with different nitrogen levels. **European Journal of Agronomy**, v.35, p.237–246, 2011.
- CARVALHO, C. H. S. de et al. Cultivares de café arábica de porte baixo. In: CARVALHO, C. H. S. de. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 334p. 2008.

CHATTOPADHYAY, S. et al. Association of leaf micro-morphological characters with powdery mildew resistance in field-grown mulberry (*Morus spp.*) germplasm. **AoB Plants**, v.2, p.1-11, 2011.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café** – Safra 2018, v.5. n.3 - Terceiro Levantamento, Brasília, p. 1-76, 2018. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe> >. Acesso em 21 de setembro de 2018.

CURVELO, C.R.S et al. Leaf gas exchange and oxidative stress on cotton plants supplied with silicon and infected by *Ramularia areola*. **Bragantia**, v.72, n.4, p. 346-359, 2013.

DEBONA, D. et al. Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, v.104, p.34–39, 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. Consórcio brasileiro de pesquisas e desenvolvimento de café. **Catiguá MG 1 e Catiguá MG 2**: cultivares de café resistentes à ferrugem (S.1), (2004). Folder.

FAZUOLI, L.C.et al. A ferrugem alaranjada do cafeeiro e a obtenção de cultivares resistentes. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 48-59, 2007.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Ann Ver Phytopathol**, Paio Alto, v. 9, p. 295-296. 1971.

GORTARI, F. et al. Plant–pathogen interactions: leaf physiology alterations in poplars infected with rust (*Melampsora medusae*). **Tree Physiology**, p.1–11, 2017.

ICO - INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Produção total de 2018**. Disponível em: <http://www.ico.org/trade_statistics.asp>. Acesso em: 20 de setembro de 2018.

JERBA, V. F.; RODELLA, R. A.; FURTADO, E. L. Relação entre a estrutura foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata f.sp. phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.3, p.217-223, 2005.

JIANG, Y. et al. Scaling of photosynthesis and constitutive and induced volatile emissions with severity of leaf infection by rust fungus (*Melampsora larici-populina*) in *Populus balsamifera* Var. suaveolens. **Tree Physiol**, v.38, p.856-872, 2016.

JOHAL, G. S. et al. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant–fungal interactions. **Canadian Journal Botany**, v.73, p.468-474, 1995.

LOURENÇO, H.A.O. et al. Anatomia foliar de diferentes cultivares de soja e sua relação com incidência e severidade de doenças. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v.4, n.3, p.37-47, 2011.

MAHAJAN, M.; DHILLON, M.; BHARDWAJ, K. Investigation of different leaf characters on muskmelon cultivars possessing grades of resistance to downy mildew disease. **Int J Pharma Bio Sci**. v.8, n.3, p. 1129-1140, 2017.

- MCCOOK, Stuart. Crônica de uma praga anunciada epidemias agrícolas e história ambiental do café nas Américas. **Varia hist.**, Belo Horizonte, v. 24, n. 39, p. 87-111, 2008.
- MELOTTO, M., W. UNDERWOOD, S.Y. HE. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. **Annu. Rev. Phytopathol**, v.46, p.101–122, 2008.
- MORAES, S.A. et al. Resistência de cafeeiros à *Pseudomonas garcae* In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS**, 2, 1974, Poços de Caldas (MG). Resumos...Rio de Janeiro; IBC, p. 183, 1974.
- MUSSURY, R.M. et al. Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.1, p.18-25, 2012.
- PANTILU, L.L. et al. Respon Morfologi dan Anatomi Kacang Kedelai (*Glycine max L.*) Terhadap Intensitas Cahaya yang Berbeda. **Jurnal Bioslogos**. v. 2, n.2,p. 79-87, 2012.
- PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M. & Bergamin Filho, A. (ed). **Manual de Fitopatologia**. Vol. 1. 4 ed. São Paulo, Ed. Agr. Ceres, Cap. 35, p. 593-636, 2011.
- PATRICIO, F.R. A.; BRAGHINI, M. T.; FAZUOLI, L.C. Resistência de plantas de *coffea arabica*, *coffea canephora* e híbridos interespecíficos à cercosporiose. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 883-890, 2010.
- PAULO, E.M; MONTES, S.M.N.M; FISCHER, I.H. Progresso temporal da ferrugem alaranjada em cultivares de cafeeiro no Oeste de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v. 80, n. 1, p. 59-64, março de 2013.
- PEREIRA, A. A. et al. Cultivares: origem e suas características. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (Ed.). **Café Arábica do plantio a colheita**. Lavras: EPAMIG. cap. 3, p. 163-221, 2010.
- PETEK, M. R.; SERA, T.; SERA, G. H.; et al. Selection of progenies of *Coffea arabica* with simultaneous resistance to bacterial blight and leaf rust. **Bragantia**, v.65, n.1, p.65-73, 2006.
- RAMIRO, D.A. et al. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology**, v. 58, p.944-955, 2009.
- REINA-PINTO, J. J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry** v.47 p.540–549, 2009.
- RIJO, L.; RODRIGUES, C. J. Processo de infecção da *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em cultivares suscetíveis e resistentes de *Coffea arabica* L. **Garcia da Orta – Série Estudos Agrônômicos**. Lisboa, v. 5, n. 1-2, p. 23-24, 1978.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, p.227-248, 2008.

- SERA G.H. et al. Resistance to leaf rust in coffee cultivars. **Coffee Science**, v. 5, n.1, p.59-66, 2010.
- SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 183-194, Mar. 2005.
- SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Braz. J. Plant Physiol.** v. 18, p. 119-147, 2006.
- STANGARLIN, J. R. et al. A Defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46. 2011.
- TALHINHAS, P. et al. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1039-1051, Oct/Nov. 2016.
- TRIVEDI, R. Morpho-anatomical characterization of groundnut genotypes showing differential reaction to late leaf spot pathogen. **SAT e Journal**, v.12, 2014.
- VARZEA, V. M. P.; MARQUES, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. (Eds.). **Durable Resistance to Coffee Leaf Rust**. Viçosa: UFV, p. 53-74, 2005.
- VILLAVERDE, V.A. et al. Variability of the stomata among ‘Albari~no’ (*Vitis vinifera* L.) clones and its relationship with susceptibility to downy mildew. **Vitis**, v.50, n.1, p.45–46, 2011.
- VOSSSEN, H. V. D.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. **Euphytica**, v.204, p.243–256, 2015.
- XAVIER, S.A. et al. Fotossíntese de folhas de soja infectadas por *Corynespora cassicola* e *Erysiphe diffusa*. **Summa phytopathol.** Botucatu, v. 41, n. 2, p. 156-159, 2015.
- XU, G. et al. Potential structural and biochemical mechanisms of compositae wild species resistance to *Alternaria tenuissima*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.58, p. 491–497, 2011.
- ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.41, p.1-8, 2016.
- ZAMBOLIM, L. et al. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.), **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, p. 369-450, 2002.
- ZAMBOLIM, L. et al. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in Brazil – Physiological variability, current situation and future prospects. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. (Eds.). **Durable Resistance to Coffee Leaf Rust**. Viçosa: UFV, p. 75-98, 2005.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Trocas gasosas e índice de clorofila de genótipos de café infectados por *Hemileia vastatrix*

*Mariana Thereza Rodrigues Viana

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme instrução do Manual de normalização da UFLA

*Doutora em Fitotecnia, Departamento de Fitotecnia, UFLA. E-mail: marianatriv@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar as trocas gasosas e o índice de clorofila em genótipos de café inoculados artificialmente com o fungo *Hemileia vastatrix*. Foram utilizadas oito progênies e duas cultivares de café. As mudas foram produzidas em viveiro e posteriormente transferidas para casa de vegetação com umidade e temperatura controladas. Após um mês de aclimação, foi realizada a inoculação artificial. As avaliações fisiológicas foram realizadas com o auxílio de um analisador de gás infravermelho (IRGA; Li-Cor Li-6400XT) e um medidor portátil de clorofila ClorofiLOG, na terceira folha completamente expandida de uma muda por parcela. Foram determinados os valores de fotossíntese líquida (A ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E : $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s : $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), carbono interno (C_i : $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), eficiência de carboxilação (A/C_i) e índice de clorofila a, b e total. Além disso, avaliou-se a incidência de doença a partir do aparecimento dos primeiros sintomas. Foram realizados a ANOVA e o teste de Scott-Knott, considerando o modelo fatorial, sendo 10 genótipos e quatro tempos de avaliações fisiológicas e cinco tempos de avaliações de incidência de doença. Posteriormente, foi feita correlação de Pearson com todos os dados. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico computacional GENES. Houve diminuição na fotossíntese líquida, na condutância estomática e na transpiração foliar e aumento do carbono interno em genótipos de café de acordo com o aumento de incidência da doença. Os teores de clorofila não foram alterados com a incidência da ferrugem. Houve correlação significativa negativa entre a incidência de doença e os parâmetros fisiológicos fotossíntese líquida e eficiência de carboxilação, e correlação significativa positiva entre a incidência de doença e concentração de carbono interno. Conclui-se que os genótipos de café apresentaram diferentes respostas fisiológicas induzidas pelo fungo *Hemileia vastatrix* ao longo das avaliações.

Palavras-chave: Ferrugem do café. Fisiologia. *Coffea arabica*.

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem alaranjada, ocasionada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., é uma das mais importantes doenças que afetam a cultura do café. O patógeno ataca folhas vivas, ocasionando pequenas manchas de cor amarelo-pálido no lado abaxial das folhas que, posteriormente, tornam-se uma massa de aspecto pulverulento (urediniósporos) alaranjada (ZAMBOLIM, 2016). Sabe-se que temperaturas entre 20 e 25 °C e umidade relativa alta favorecem o desenvolvimento do fungo (BEDENDO, 2011). A doença ocasiona a redução da área fotossinteticamente ativa das folhas e, em ataques severos, pode ocorrer desfolha, levando à morte de galhos e causando perdas de produtividade que vão de 30% a 50%, em lavouras cafeeiras (ZAMBOLIM, 2016).

A forma mais eficiente de controle da ferrugem é por meio da utilização de genótipos resistentes, visto que o controle químico pode não ser eficiente, além do aumento dos custos de produção da cultura (PETEK; SERA; FONSECA, 2008). Porém, fungos biotróficos, como a ferrugem, apresentam elevada variabilidade genética, com potencial para o surgimento de novas raças fisiológicas e isso tem sido um desafio enfrentado pelos programas de melhoramento de café. A principal fonte de genes para a resistência à ferrugem do cafeeiro utilizada nos programas de melhoramento é o germoplasma derivado do Híbrido de Timor, originado de um cruzamento natural entre *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (VARZEA; MARQUES, 2005).

As doenças foliares podem causar diversas alterações fisiológicas no hospedeiro, diretamente, por meio da secreção de toxinas e enzimas, ou indiretamente, por meio de respostas induzidas pela interação patógeno-hospedeiro (ALVES et al., 2011). Dentre os processos fisiológicos relevantes, a fotossíntese, a condutância estomática e a transpiração são os mais afetados (DEBONA et al., 2014; CARRETERO; BANCAL; MIRALLES, 2011; GORTARI et al., 2017; BASSANEZI et al., 2001). Além disso, os sintomas nas folhas podem causar danos às células do mesófilo, às membranas e ao funcionamento da maquinaria enzimática (BERGER et al., 2007).

Características fotossintéticas, como as trocas gasosas e o índice de clorofila, são métodos de avaliação não invasivos e úteis para avaliar e quantificar o comportamento da atividade fotossintética em plantas sob condições de estresse, incluindo os causados pela infecção por patógenos (BERGER et al., 2007; TATAGIBA; RODRIGUES; DAMATTA, 2014). Algumas respostas fisiológicas das plantas às infecções estão bem elucidadas em alguns patossistemas. Por exemplo, a fotossíntese foi reduzida em 80% em *Phaseolus vulgaris* L. infectado com *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger. (BASSANEZI et al., 2001); plantas de

eucalipto infectadas com *Puccinia psidii* apresentaram redução da fotossíntese após o aparecimento de sintomas (ALVES et al., 2011) e houve redução da condutância estomática na interação do arroz com o fungo *Bipolaris oryzae* (DALLAGNOL et al., 2011).

Sabe-se que os parâmetros relacionados à condição fisiológica do fotossistema II e componentes da cadeia de transporte de elétrons podem ser indicadores úteis do estado fisiológico do cafeeiro, inclusive prevendo a capacidade da planta de resistir à ferrugem (TONIUTTI et al., 2017). Porém, apesar dos esforços para elucidar os mecanismos pelos quais os patógenos são capazes de afetar a fisiologia das plantas, pouco se sabe sobre as respostas fisiológicas da interação *Hemileia vastatrix* e cafeeiro.

O conhecimento da forma pela qual o patógeno altera a fisiologia e, conseqüentemente, o crescimento da planta hospedeira, fornece informações sobre os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro, a fim de auxiliar no gerenciamento de estratégias de controle ou manejo das doenças, permitindo a supressão ou a redução dos danos causados às culturas (BASSO et al., 2010, RESENDE et al., 2012). Além disso, entender as mudanças fisiológicas que ocorrem em plantas infectadas por patógenos pode auxiliar na prevenção dos efeitos negativos sobre o crescimento e o rendimento das culturas (BASTIAANS, 1991). Diante disso, objetivou-se avaliar as trocas gasosas e o índice de clorofila de genótipos de café inoculados artificialmente com o fungo *Hemileia vastatrix*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das sementes para a formação de mudas

O Banco Ativo de Germoplasma de Café do Estado de Minas Gerais pertence à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) e está instalado, desde o ano de 2004, na Fazenda Experimental de Patrocínio, localizada na região do Alto Paranaíba. Atualmente, conta com, aproximadamente, 1.500 genótipos e apresenta grande variabilidade genética, constituída de fontes de resistência a pragas e doenças do cafeeiro.

No presente trabalho, foram selecionados, do referido Banco de Germoplasma, oito genótipos de *Coffea arabica* oriundos do cruzamento entre Dilla & Alghe e Híbridos de Timor, do grupo dos genótipos resistentes à ferrugem. Além desses materiais, foram utilizadas duas cultivares, sendo uma considerada resistente, ‘Catiguá MG 3’ (EPAMIG, 2004) e outra suscetível, ‘Topázio MG 1190’ (CARVALHO et al., 2017) (Tabela 1).

Tabela 1 - Genótipos selecionados do Banco de Germoplasma de Minas Gerais, em Patrocínio, MG.

Nº	Genótipo	Genealogia
1	MG 0579	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-01
2	MG 0580	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-03
3	MG 0581	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-06
4	MG 0582	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-07
5	MG 0583	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-09
6	MG 0587	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-25
7	MG 0588	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-30
8	MG 0591	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-48
9	Catiguá MG3	Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 440-10
10	Topázio MG1190	Catuaí x Mundo Novo

Fonte: Da autora (2018).

2.2 Produção de mudas, instalação do experimento e inoculação

Com as sementes dos genótipos selecionados (Tabela 1), mudas foram produzidas em viveiro com 30% de sombreamento e irrigação controlada. A semeadura foi feita em sacos plásticos de polietileno, contendo substrato padrão (composto de 700 L de subsolo e 300 L de esterco de curral por metro cúbico de mistura, sendo adicionados 5 kg de superfosfato simples e 0,5 kg de cloreto de potássio), de acordo com Guimarães et al. (1999). Cada saco plástico recebeu três sementes. Foi realizado um desbaste nas parcelas que apresentavam mais de uma plântula emersa, quando as mudas encontravam-se no estágio de “orelha de onça” (iniciando a emissão do primeiro par de folhas verdadeiras), permanecendo apenas uma muda por recipiente.

Quando as mudas apresentaram, aproximadamente, três pares de folhas verdadeiras, foram selecionadas as mais vigorosas e uniformes, e, então, levadas para casa de vegetação, onde foi realizada a aclimatação. Durante todo o período experimental, as mudas foram irrigadas periodicamente, utilizando-se um sistema de irrigação com nebulizador de baixa vazão, e controle de temperatura (23°C) e umidade relativa do ar (70%). As mudas receberam adubações complementares, de acordo com recomendações técnicas para a cultura (GUIMARÃES et al., 1999).

Após um mês de aclimatação, as plantas (com aproximadamente quatro pares de folhas verdadeiras) foram inoculadas artificialmente. Os esporos de *H. vastatrix* foram obtidos a partir de folhas naturalmente infectadas de plantas de cafeeiro no campo, os quais foram coletados por meio de raspagem das pústulas e acondicionados em microtubos, protegidos da luz. Para a inoculação artificial das plantas foi preparada uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^5 urediniósporos mL⁻¹ ágar-água (0,2% p/v), contendo Tween 20 (0,05% v/v) (SALUSTIANO et al., 2008). Posteriormente, a solução foi pulverizada em toda a muda, na parte abaxial das folhas, com o auxílio de um pulverizador manual. As mudas foram submetidas a uma câmara úmida na própria casa de vegetação, no escuro, pelo período de 72 horas. O delineamento adotado foi em blocos casualizados, com três repetições, sendo cada parcela constituída de três plantas.

2.3 Obtenção dos dados microclimáticos

No interior da casa de vegetação foi instalado um sensor de temperatura e umidade relativa do ar, modelo Onset HOBO datalogger. Os dados foram coletados e armazenados pelo datalogger em todo o período experimental.

As datas de avaliação foram as seguintes: 3 DAI (dias após a inoculação), 12/05/2017; 45 DAI (dias após a inoculação), 26/06/2017; 52 DAI (dias após a inoculação), 03/07/2017; 60 DAI (dias após a inoculação), 13/07/2017; 67 DAI (dias após a inoculação), 20/07/2017 e 75 DAI (dias após a inoculação), 28/07/2017.

2.4 Incidência de ferrugem

Em cada muda foram realizadas cinco avaliações com intervalos de sete dias, sendo a primeira realizada após o aparecimento dos primeiros sintomas, a fim de quantificar as folhas infectadas e não infectadas. A incidência de ferrugem foi avaliada nos tempos 45 DAI, 52 DAI, 60 DAI, 67 DAI e 75 DAI.

A incidência da ferrugem foi calculada de acordo com a equação (CAMPBELL; MADDEN, 1990)

$$I (\%) = \left(\frac{NFD}{NTF} \right) * 100$$

sendo

I (%) = incidência da ferrugem no cafeeiro, NFD = número de folhas doentes, NTF = número total de folhas amostradas.

2.5 Avaliações fisiológicas

As análises fisiológicas foram realizadas em quatro tempos, sendo eles 3 DAI, 45 DAI (início do aparecimento de sintomas), 60 DAI e 75 DAI.

2.5.1 Trocas gasosas

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas no período da manhã, entre 9 e 11 horas, com o auxílio de um analisador de gás por infravermelho (IRGA; Li-Cor Li-6400XT), na terceira folha completamente expandida de uma muda por parcela. Sua câmara de LED foi programada para uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram determinados os valores de fotossíntese líquida (A: $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração foliar (E: $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs: $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração de carbono interno (Ci: $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$) e eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci) (SILVA et al., 2010).

2.5.2 Índice de clorofila

Os índices de clorofila a, b e total foram obtidos por meio do medidor portátil de clorofila ClorofiLOG (FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA, BRASIL), que fornece valores denominados índices de clorofila Falker (ICF) proporcionais à absorvância das clorofilas. Os índices obtidos com o ClorofiLOG são equivalentes aos teores relativos das clorofilas a, b e total (BARBIERI JÚNIOR et al., 2012).

2.6 Análise estatística

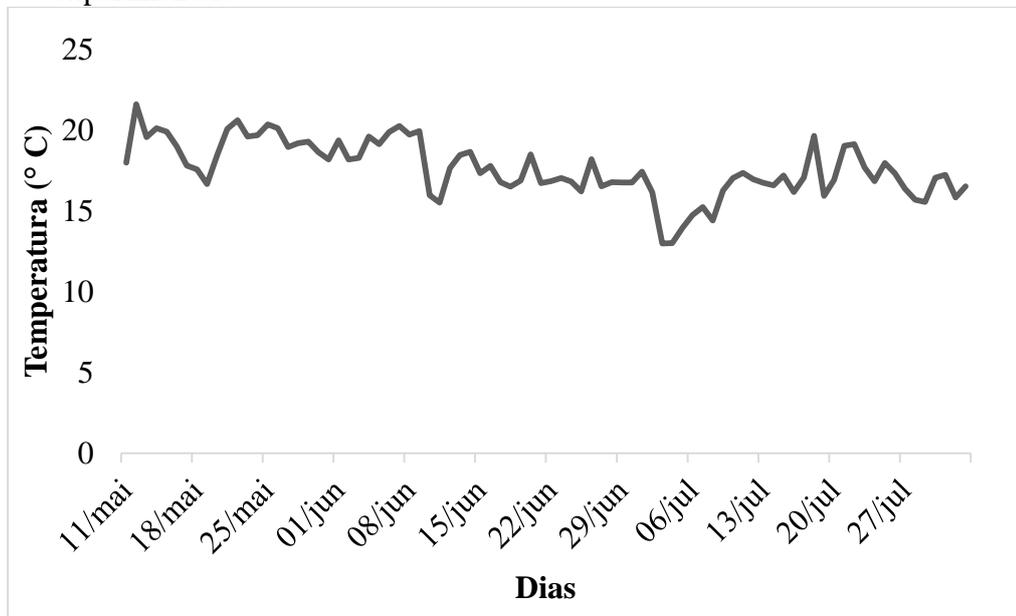
Inicialmente, foi realizado um teste de Lilliefors para verificar o atendimento às pressuposições de normalidade dos erros. Para todas as características fisiológicas foi realizada a análise de variância (ANOVA), a 5% de probabilidade, pelo teste F, considerando o modelo matemático fatorial (10 x 4), sendo 10 genótipos e quatro tempos de avaliação. Para a incidência de ferrugem foi realizada a análise de variância (ANOVA), a 5% de probabilidade, pelo teste F, considerando o modelo matemático fatorial (10 x 5), sendo 10 genótipos e cinco tempos de avaliação. Posteriormente, foi realizado o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para o agrupamento das médias. Também foi realizada correlação de Pearson, a fim de correlacionar a incidência de doença com as características fisiológicas e entre si. Todas as análises foram realizadas no programa computacional GENES (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS

3.1 Dados microclimáticos

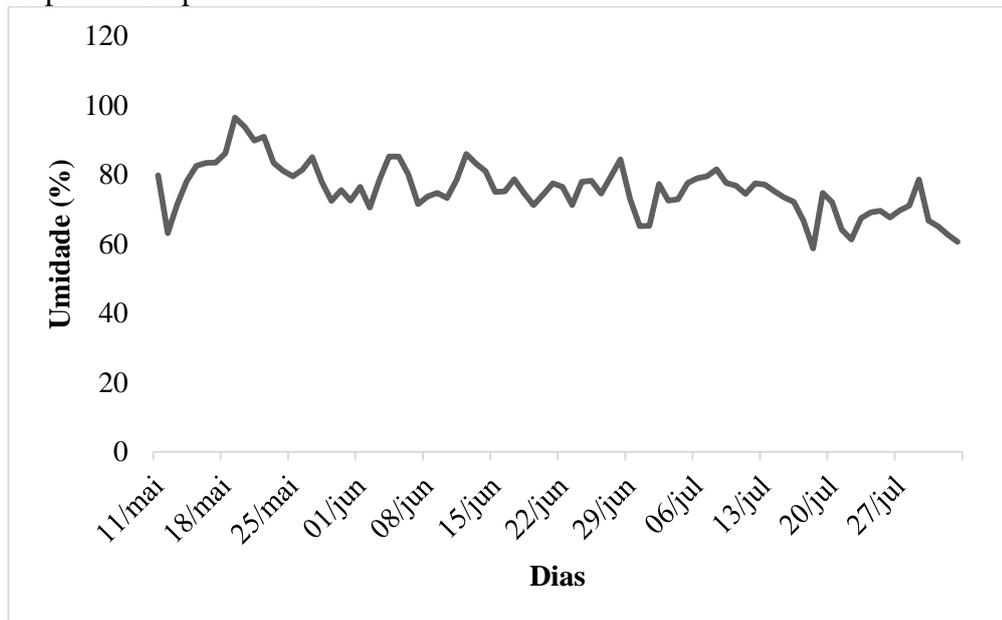
As temperaturas médias ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade relativa do ar média (%), ao longo do tempo de avaliação na casa de vegetação, estão apresentadas nas Figuras 1 e 2. Aos 3 DAI (12/05/17), a temperatura média foi de $21,6^{\circ}\text{C}$ e 63,18% de umidade relativa do ar média. Aos 45 DAI (26/06/2017), quando houve aparecimento dos primeiros sintomas de ferrugem, a temperatura média foi de $18,20^{\circ}\text{C}$ e 74,6% de umidade relativa do ar média. Aos 52 DAI (03/07/2017), a temperatura média estava baixa com 13°C e a umidade relativa do ar média de 74,5%. Aos 60 DAI (13/07/2017), a temperatura média foi de $16,75^{\circ}\text{C}$ e 77,1% de umidade relativa do ar média. Aos 67 DAI (20/07/2017), a temperatura média foi de 17°C e 72% de umidade relativa do ar média. Na última avaliação, aos 75 DAI (28/07/2017), a temperatura média foi de $15,7^{\circ}\text{C}$ e 71% de umidade relativa do ar média. Ao longo do tempo de avaliação do experimento, dentro da casa de vegetação, observou-se variação da umidade relativa média do ar de 58,6% a 96,4%; já a temperatura variou de $12,9^{\circ}\text{C}$ a $21,5^{\circ}\text{C}$ (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - Temperatura média ($^{\circ}\text{C}$), ao longo dos dias, na casa de vegetação, durante o período experimental.



Fonte: Da autora (2018).

Figura 2 - Umidade relativa do ar média (%), ao longo dos dias, na casa de vegetação, durante o período experimental.



Fonte: Da autora (2018).

3.2 Análise de incidência de ferrugem

Houve necessidade de transformação dos dados após a verificação de não normalidade de acordo com o teste de Lilliefors. Foi calculada a raiz quadrada mais uma constante 1 de cada observação para a característica incidência de ferrugem.

Os genótipos MG 0579, MG 0582, MG 0591, Catiguá MG 3 e Topázio MG 1190 apresentaram esporulação em pelo menos algum tempo de avaliação (Tabela 2).

Embora os genótipos MG 0579 e MG 0591 tenham apresentado incidência de ferrugem aos 60 DAI, eles foram agrupados com os genótipos que não apresentaram sintomas de doença, de acordo com o teste de agrupamento de médias (Tabela 2). Eles foram separados em três grupos, tendo as maiores incidências sido observadas no genótipo Topázio MG 1190, seguido pelo Catiguá MG 3 e MG 0582, que apresentaram os mesmos níveis de doença. Os demais genótipos foram considerados imunes à ferrugem (Tabela 2).

Tabela 2 - Incidência (%) de ferrugem em genótipos cafeeiros submetidos à inoculação artificial, em diferentes tempos de avaliação.

Genótipos	Incidência de ferrugem (%)				
	45 DAI	52 DAI	60 DAI	67 DAI	75 DAI
MG 0579	0 Ac	0 Ac	1,85 Ac	0 Ac	0 Ac
MG 0580	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac
MG 0581	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac
MG 0582	6,17 Cb	29,63 Bb	41,67 Ab	54,63 Ab	44,44 Ab
MG 0583	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac
MG 0587	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac
MG 0588	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac
MG 0591	0 Ac	0 Ac	0,93 Ac	0 Ac	0 Ac
Catiguá MG3	6,79 Cb	26,85 Bb	40,74 Ab	49,07 Ab	43,52 Ab
Topázio MG1190	11,73 Ba	54,63 Aa	65,74 Aa	76,85 Aa	71,3 Aa
CV (%)	35,84	28,76	30,51	18,57	19,84

Letras maiúsculas comparam a incidência de ferrugem (%) nas mudas entre as épocas de avaliações para cada genótipo; letras minúsculas comparam a incidência de ferrugem entre os genótipos, em cada época de avaliação; letras diferentes indicam diferença significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Da autora (2018).

3.3 Análise de trocas gasosas e índice de clorofila

Houve diminuição da taxa fotossintética líquida em genótipos que foram imunes à doença, quando inoculados artificialmente, com exceção do MG 0580, que teve um aumento de até 67,50% na taxa fotossintética ao longo do tempo. De maneira geral, os maiores valores de taxa fotossintética são observados aos 3 DAI. O genótipo MG 0588 se destacou quando comparado aos demais, pois foi agrupado, em quase todas as avaliações, com os genótipos que apresentaram maior taxa fotossintética líquida (Tabela 3).

Tabela 3 - Fotossíntese líquida (A) de genótipos cafeeiros submetidos à inoculação em diferentes tempos de avaliação.

Genótipos	Fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			
	3 DAI	45 DAI	60 DAI	75 DAI
MG 0579	2,56 Be	3,10 Ad	1,26 Ce	2,93 Ad
MG 0580	2,04 Cf	3,80 Ab	2,75 Bc	3,73 Ab
MG 0581	3,49 Ad	1,88 Bf	0,47 Cf	1,59 Bf
MG 0582	3,89 Ac	2,91 Bd	3,31 Bc	3,84 Ab
MG 0583	3,58 Bd	4,11 Aa	4,45 Aa	3,03 Cd
MG 0587	6,69 Aa	3,43 Cc	3,82 Bb	3,13 Cd
MG 0588	6,90 Aa	4,02 Ba	4,04 Bb	4,34 Ba
MG 0591	3,99 Ac	3,60 Ab	3,04 Bc	2,44 Ce
Catiguá MG3	3,40 Ad	2,49 Be	1,75 Cd	2,18 Be
Topázio MG1190	4,85 Ab	1,22 Cg	1,68 Cd	3,47 Bc
CV (%)	4,26	7,30	10,02	5,64

Letras maiúsculas comparam a fotossíntese líquida nas mudas entre as épocas de avaliações para cada genótipo; letras minúsculas comparam a fotossíntese líquida entre os genótipos, em cada época de avaliação; letras diferentes indicam diferença significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Da autora (2018).

Os genótipos MG 0581 e Topázio MG 1190 tiveram redução, ao longo do tempo, na condutância estomática de, aproximadamente, 22% e 34%, respectivamente. Observou-se aumento da condutância estomática após a esporulação nos genótipos MG 0582, Catiguá MG3, MG 0579 e MG 0591 em mais de 100%. O genótipo Topázio MG 1190 teve queda de 80% após a esporulação e de 33%, ao longo do tempo, na condutância estomática. O genótipo MG 0581 apresentou o mesmo comportamento ao longo do tempo (Tabela 4).

Tabela 4 - Condutância estomática (gs) de genótipos cafeeiros submetidos à inoculação artificial e sem inoculação, em diferentes tempos de avaliação.

Genótipos	Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			
	3 DAI	45 DAI	60 DAI	75 DAI
MG 0579	0,013 Bd	0,026 Bd	0,090 Ad	0,018 Bd
MG 0580	0,022 Cd	0,059 Bb	0,158 Aa	0,036 Cd
MG 0581	0,038 Ac	0,027 Ad	0,030 Af	0,032 Ad
MG 0582	0,038 Cc	0,080 Ba	0,133 Ab	0,044 Cc
MG 0583	0,024 Cd	0,070 Ba	0,070 Be	0,117 Aa
MG 0587	0,081 Ab	0,058 Bb	0,082 Ad	0,035 Cd
MG 0588	0,108 Aa	0,033 Cd	0,029 Cf	0,081 Bb
MG 0591	0,028 Cd	0,046 Bc	0,123 Ac	0,053 Bc
Catiguá MG3	0,019 Cd	0,044 Bc	0,115 Ac	0,038 Bd
Topázio MG1190	0,063 Bc	0,013 De	0,083 Ad	0,029 Cd
CV (%)	13,81	11,10	16,54	7,39

Letras maiúsculas comparam a condutância estomática nas mudas entre as épocas de avaliações para cada genótipo; letras minúsculas comparam a condutância estomática entre os genótipos, em cada época de avaliação; letras diferentes indicam diferença significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Da autora (2018).

Maiores valores de carbono interno foram observados aos 60 DAI. O genótipo Topázio MG 1190, considerado suscetível, apresentou queda de 25% no carbono interno entre a primeira e a última avaliação (Tabela 5).

Maiores taxas de transpiração foram observadas aos 3 DAI. Quando ocorreu a esporulação, os genótipos MG 0591, MG 0579 e Catiguá MG 3 tiveram aumento de mais de 100% na transpiração; já os genótipos MG 0582 e Topázio MG 1190 apresentaram queda na transpiração em mais de 50% (Tabela 6).

Tabela 5 - Concentração de carbono interno (Ci) em genótipos cafeeiros submetidos à inoculação artificial, em diferentes tempos de avaliação.

Genótipos	Concentração de carbono interno ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$)			
	3 DAI	45 DAI	60 DAI	75 DAI
MG 0579	316,09 Ba	313,45 Ba	319,51 Bb	405,46 Aa
MG 0580	227,52 Cb	249,11 Cb	337,53 Ab	293,25 Bc
MG 0581	224,56 Cb	232,62 Cb	385,32 Aa	348,38 Bb
MG 0582	273,89 Ba	311,40 Ba	353,94 Ab	195,36 Ce
MG 0583	290,62 Ba	275,78 Bb	345,65 Ab	355,48 Ab
MG 0587	249,77 Bb	256,39 Bb	374,68 Aa	346,73 Ab
MG 0588	273,88 Ca	259,73 Cb	385,14 Aa	316,24 Bc
MG 0591	218,44 Cb	252,52 Bb	333,69 Ab	276,94 Bd
Catiguá MG3	306,92 Ca	276,06 Cb	391,47 Aa	342,90 Bb
Topázio MG1190	299,93 Ba	309,52 Ba	387,84 Aa	223,47 Ce
CV (%)	9,90	8,02	6,49	3,30

Letras maiúsculas comparam a concentração de carbono interno nas mudas entre as épocas de avaliações para cada genótipo; letras minúsculas comparam a concentração de carbono interno entre os genótipos, em cada época de avaliação; letras diferentes indicam diferença significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Da autora (2018).

Tabela 6 - Transpiração foliar (E) em genótipos cafeeiros submetidos à inoculação artificial, em diferentes tempos de avaliação.

Genótipos	Transpiração foliar (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)			
	3 DAI	45 DAI	60 DAI	75 DAI
MG 0579	0,15 Bd	0,28 Bb	0,96 Aa	0,17 Bd
MG 0580	0,36 Ac	0,33 Ab	0,44 Ac	0,53 Ac
MG 0581	0,47 Ac	0,31 Bb	0,45 Ac	0,64 Ab
MG 0582	0,88 Ab	0,27 Cb	1,02 Aa	0,65 Bb
MG 0583	0,87 Ab	0,62 Ba	0,65 Bc	1,04 Aa
MG 0587	0,86 Ab	0,46 Ba	0,41 Bc	0,24 Cd
MG 0588	1,12 Aa	0,60 Ba	0,48 Cc	0,37 Cc
MG 0591	0,35 Bc	0,18 Bb	0,80 Ab	0,21 Bd
Catiguá MG3	0,19 Cd	0,49 Ba	0,53 Bc	0,87 Aa
Topázio MG1190	0,76 Ab	0,18 Cb	0,73 Ab	0,44 Bc
CV (%)	18,77	23,21	18,60	18,54

Letras maiúsculas comparam a transpiração foliar nas mudas entre as épocas de avaliações para cada genótipo; letras minúsculas comparam a transpiração foliar entre os genótipos, em cada época de avaliação; letras diferentes indicam diferença significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Da autora (2018).

As maiores eficiências de carboxilação foram observadas aos 3 DAI. O genótipo MG 0580 teve aumento, ao longo do tempo, de 30%, quando inoculado, comparado aos demais genótipos (Tabela 7).

Os genótipos MG 0582 e Topázio MG 1190 apresentaram menores índices de clorofila a aos 3 DAI e aos 75 DAI, em comparação às outras avaliações (Tabela 8).

Tabela 7 - Eficiência de carboxilação (A/Ci) em genótipos de café com inoculação artificial, em diferentes tempos de avaliação.

Genótipos	Eficiência de carboxilação			
	3 DAI	45 DAI	60 DAI	75 DAI
MG 0579	0,008 Be	0,010 Ab	0,004 Cd	0,007 Be
MG 0580	0,009 Ce	0,015 Aa	0,008 Cc	0,012 Bc
MG 0581	0,015 Ac	0,008 Bb	0,001 De	0,004 Cf
MG 0582	0,014 Bc	0,009 Cb	0,010 Cc	0,019 Aa
MG 0583	0,012 Bd	0,014 Aa	0,013 Ba	0,008 Cd
MG 0587	0,027 Aa	0,013 Ba	0,010 Cb	0,009 Cd
MG 0588	0,026 Aa	0,015 Ba	0,011 Cb	0,013 Bc
MG 0591	0,019 Ab	0,014 Ba	0,009 Cc	0,008 Cd
Catiguá MG3	0,011 Ad	0,009 Ab	0,005 Cd	0,006 Be
Topázio MG1190	0,016 Ac	0,004 Bc	0,004 Bd	0,015 Ab
CV (%)	8,74	13,16	8,20	7,40

Letras maiúsculas comparam a eficiência de carboxilação nas mudas entre as épocas de avaliações para cada genótipo; letras minúsculas comparam a eficiência de carboxilação entre os genótipos, em cada época de avaliação; letras diferentes indicam diferença significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Da autora (2018).

Tabela 8 - Índice de clorofila a em genótipos de café com inoculação artificial em diferentes tempos de avaliação.

Genótipos	Índice de clorofila a			
	3 DAI	45 DAI	60 DAI	75 DAI
MG 0579	396,33 Aa	425,67 Aa	437,00 Aa	379,33 Aa
MG 0580	391,67 Aa	392,00 Aa	400,67 Aa	392,67 Aa
MG 0581	394,33 Aa	413,67 Aa	399,67 Aa	386,26 Aa
MG 0582	391,67 Ba	451,67 Aa	440,00 Aa	388,00 Ba
MG 0583	393,67 Aa	415,67 Aa	455,67 Aa	417,00 Aa
MG 0587	421,00 Aa	411,33 Aa	446,00 Aa	404,67 Aa
MG 0588	417,33 Aa	443,33 Aa	405,67 Aa	378,33 Aa
MG 0591	403,00 Aa	426,00 Aa	417,00 Aa	420,67 Aa
Catiguá MG3	417,67 Aa	450,00 Aa	438,00 Aa	401,50 Aa
Topázio MG1190	392,33 Ba	438,67Aa	429,00 Aa	370,00 Ba
CV (%)	6,81	11,50	6,03	7,33

Letras maiúsculas comparam o índice de clorofila a nas mudas entre as épocas de avaliações para cada genótipo; letras minúsculas comparam a índice de clorofila a entre os genótipos, em cada época de avaliação; letras diferentes indicam diferença significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Da autora (2018).

2.1 Correlação de Pearson

Houve correlação significativa negativa entre a incidência de doença e os parâmetros fisiológicos A e A/Ci e correlação significativa positiva entre a incidência de doença e Ci. Houve correlação significativa positiva entre A x A/Ci, A x gs, índice de clorofila a x índice de clorofila total e índice de clorofila b x índice de clorofila total (Tabela 9).

Tabela 9 - Correlação de Pearson para as variáveis fisiológicas e incidência de doença em genótipos de café inoculados artificialmente com *Hemileia vastatrix*.

Variáveis	Inc.	A	gs	E	Ci	A/Ci	Clor a	Clor b	Clor total
Inc.	1	-0,67*	-0,16	-0,35	0,64*	-0,78**	-0,15	0,04	0,51
A		1	0,93**	0,54	-0,28	0,97**	0,31	0,14	0,38
gs			1	0,29	-0,03	0,51	-0,11	0,04	0,36
E				1	-0,25	0,51	0,05	0,62	0,22
Ci					1	-0,51	0,55	0,02	0,41
A/Ci						1	0,44	0,10	0,35
Clor a							1	0,35	0,91**
Clor b								1	0,68*
Clor Total									1

** *: Significativo, a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Inc: incidência de ferrugem; A: fotossíntese líquida; gs: condutância estomática; E: transpiração foliar; Ci: carbono interno; A/Ci: eficiência de carboxilação; Clor a: índice de clorofila a; Clor b: índice de clorofila b; Clor total: índice de clorofila total.

Fonte: Da autora (2018).

3 DISCUSSÃO

A umidade, na forma de chuva ou irrigação, atua na disseminação e na dispersão dos urediniósporos de *Hemileia vastatrix*, além de proporcionar água em estado líquido para a sua germinação (BEDENDO, 2011). Os genótipos foram expostos a um ambiente com temperatura, umidade e vento propícios à disseminação e ao desenvolvimento da doença.

As cultivares do grupo Catiguá oriundas dos cruzamentos entre Catuaí e Híbrido de Timor apresentam resistência às raças predominantes de ferrugem no Brasil, porém, já ocorreu a quebra de resistência por novas raças em alguns ambientes (CARVALHO; CHALFOUN; CUNHA, 2010). Embora a cultivar Catiguá MG 3 tenha apresentado incidência de ferrugem, ela se mostrou tolerante ao patógeno, visto que esta incidência se apresentou em índice intermediário, principalmente quando não foi inoculada artificialmente, sendo menor que na cultivar Topázio MG 1190, que é considerada suscetível. Carvalho et al. (2017), avaliando cultivares comerciais de café no município de Lavras, MG, quanto à resistência à ferrugem, também encontraram níveis intermediários de incidência e severidade da doença em cultivares Catiguá MG 3, no campo.

Foi observada baixa incidência de doença em progênies derivadas do Híbrido de Timor, consideradas a principal fonte de genes de resistência à ferrugem do café (CAPUCHO et al, 2009), tendo os genótipos MG 0579 e MG 0591 sido agrupados com os genótipos imunes, mesmo quando apresentaram doença. A incidência intermediária de ferrugem de uma progênie é importante, considerando que não é possível selecionar progênies com resistência horizontal em materiais que não apresentam incidência da doença, pois esses, provavelmente, apresentam resistência do tipo vertical ou específica, que impede a manifestação da resistência horizontal (BOTELHO et al., 2010).

Os principais efeitos dos patógenos foliares biotróficos estão nos processos fotossintéticos (BERGER et al., 2007; DOMICIANO et al., 2009; DALLAGNOL et al., 2011). As maiores reduções na fotossíntese ocorrem quando, na interação patógeno x hospedeiro, o hospedeiro é suscetível (ROLFE; SCHOLE, 2010); genótipos que apresentaram sintomas de doença tiveram maiores reduções nas taxas fotossintéticas. Pode-se observar redução da taxa fotossintética líquida nas plantas que foram imunes à doença e que foram inoculadas com o patógeno, com exceção de MG 0580. Em outros trabalhos também foi relatada a redução da fotossíntese em interações incompatíveis (SCHARTE; SCHÖN; WEIS, 2005; BONFIG et al., 2006; SWARBRICK; SCHULZE-LEFERT; SCHOLE, 2006).

A diminuição da taxa fotossintética líquida de folhas causadas por patógenos foliares pode ser devido, principalmente, ao aumento da taxa respiratória do patógeno, a alterações na condutância estomática ou a efeitos sobre a enzima responsável pela fixação de CO₂ (BERGER et al., 2007). O método de avaliação das trocas gasosas utilizado no presente trabalho não discrimina a origem do CO₂ assimilado. Assim, a contribuição da respiração fúngica para a aparente diminuição na fotossíntese líquida das folhas é desconhecida, embora exista clara relação positiva entre a taxa de respiração e a infecção do patógeno (GORTARI et al., 2017).

Honorato Junior et al. (2015), estudando o efeito das variáveis fisiológicas na aplicação de fungicidas para o controle da ferrugem do café, encontraram efeito negativo na fotossíntese líquida de folhas de cafeeiro inoculadas artificialmente com *H.vastatrix*, nos tratamentos que não receberam aplicação de fungicidas, sendo consideradas como controle no trabalho em questão. De acordo com os autores, a fotossíntese foi impactada negativamente, possivelmente devido a danos oxidativos e alterações no centro de reação do fotossistema II.

Os maiores valores da taxa fotossintética líquida foi aos 3 DAI, sendo que a temperatura média da casa de vegetação nesse dia estava próxima de 22 °C e, nos demais dias avaliados, a temperatura se manteve abaixo de 20 °C. De acordo com Rena e Maestri (1985), a temperatura ótima para a assimilação de CO₂ no cafeeiro varia de 20 a 30 °C, dependendo da temperatura em que as plantas foram aclimatadas nos dias anteriores. Menores valores de A foram observados quando a casa de vegetação apresentava temperaturas abaixo de 20 °C. Baixas temperaturas podem estar associadas a menores taxas fotossintéticas, como observado em um estudo realizado com genótipos de café em vasos, com relatos de diminuições em A quando a temperatura era de 13 a 17 °C ou abaixo (RAMALHO et al., 2003).

A fotossíntese apresentou correlação negativa com a incidência de doença. Debona et al. (2014) também observaram correlação negativa entre a incidência de doença e a fotossíntese em plantas de trigos infectadas com o fungo *Pyricularia oryzae*. A forma como as alterações fisiológicas em folhas infectadas por fungos biotróficos estão relacionadas com o aumento da infecção fúngica ainda não está clara, embora as infecções possam levar à formação de áreas cloróticas e necróticas (JIANG et al., 2016). Como a formação de hifas e haustórios do fungo *H. vastatrix* se estende para o mesófilo da folha (SILVA et al., 2006), o principal tecido fotossintético, é mais provável que grande parte da diminuição da fotossíntese, em tecidos doentes, esteja relacionada com a capacidade bioquímica prejudicada para fixação do CO₂ no cloroplasto (CURVELO et al., 2013).

Yang et al. (2016), estudando as respostas fisiológicas da inoculação de *Fusarium graminearum*, causador da fusariose do trigo, observaram que a inoculação do

patógeno resultou em diminuição de gs na linhagem resistente, mas não na linhagem suscetível, sete dias após a inoculação, quando a planta ainda não apresentava sintomas de doença, o que pode ser observado neste trabalho, já que a cultivar Topázio MG 1190 é considerada suscetível e as demais apresentam alguma fonte de resistência. É possível que a planta que apresenta, genes de resistência ative o sistema de defesa e feche seus estômatos a fim de dificultar a entrada do patógeno, já que a ferrugem penetra pelos estômatos (STANGARLIN et al., 2011).

A causa da diminuição da condutância estomática em genótipos que apresentaram sintomas de doenças pode ser pelo fato de que, 36 horas após a inoculação, já ocorre a colonização de hifas nos espaços intercelulares do mesofilo e na câmara subestomática, interrompendo o funcionamento normal dos estômatos (GORTARI et al., 2017).

Houve correlação positiva entre a fotossíntese e a condutância estomática. Em âmbito foliar, em muitas espécies, incluindo café, gs é fortemente correlacionada com A, sugerindo que não somente A, mas também gs, seja um fator chave que limite o rendimento das culturas (DAMATTA et al., 2007).

O aumento da condutância estomática após a esporulação pode ser devido ao fato de que, no gênero *Hemileia*, o hábito de esporulação seja por meio dos estômatos, ou seja, a colonização do mesofilo dá origem às pústulas, que esporulam através dos estômatos (BEDENDO, 2011). Porém, o genótipo Topázio MG 1190, considerado suscetível, teve queda de 80% após a esporulação e 33% ao longo do tempo, na condutância estomática. É possível que uma maior respiração fúngica aumente a concentração intercelular de CO₂ e isso pode contribuir para reduzir a condutância estomática nesse genótipo (LOPES; BERGER, 2001; MANDAL et al., 2009; ZHAO et al., 2011).

Maiores valores de carbono interno foram observados em alguns genótipos que apresentaram incidência de doença. Houve também correlação positiva entre a incidência de doença e o carbono interno. A maior concentração de carbono interno pode estar associada ao dano na capacidade de fixação de CO₂ no mesofilo ou à maior respiração fúngica (ZHAO et al., 2011). Resultados semelhantes também foram relatados nas interações arroz-*Bipolaris oryzae* (DALLAGNOL et al., 2011) e eucalipto-*Mycosphaerella* sp. (PINKARD; MOHAMMED, 2006).

O genótipo Topázio MG 1190, considerado suscetível, apresentou queda de 25% no carbono interno entre a primeira e a última avaliação, e essa queda foi também associada com uma queda na condutância estomática de, aproximadamente, 35%. Normalmente, menores valores de condutância estomática estão associados a menores valores de difusão de CO₂ para a câmara subestomática (SILVA et al, 2015). Dessa forma, para o genótipo Topázio MG 1190,

as reduções em A podem estar mais associadas às limitações do influxo de CO₂ nas folhas do que às limitações bioquímicas no cloroplasto (CURVELO et al., 2013).

Reduções nos valores de A e g_s e aumentos nos valores de C_i têm sido relatados na interação *Eucalyptus urophylla* com *Puccinia psidii* (ALVES et al., 2011), feijão com o fungo *Uromyces appendiculatus* (BASSANEZI et al., 2002) e soja com *Phakopsora pachyrhizi* (RIOS et al., 2017), todos fungos biotróficos como a ferrugem do café. De acordo com esses autores, as reduções na taxa fotossintética não foram associadas somente à menor entrada de CO₂ nas folhas, mas também a alguma limitação bioquímica na fixação de CO₂ dentro dos cloroplastos.

A redução na transpiração pode estar relacionada com a destruição da cutícula e dos estômatos (CURVELO et al., 2013), além de reduções dos espaços do mesofilo, ocasionadas pelas hifas do fungo da ferrugem, afetando também a condutância estomática das plantas. Porém, quando esporularam, os genótipos MG 0591, MG 0579 e Catiguá MG 3 tiveram um aumento de mais de 100% na transpiração. Mesmo em baixas incidências de doença, algumas infecções causadas por ferrugem resultam em um aumento na taxa de transpiração foliar ao ocorrer a esporulação, devido ao aumento da abertura estomática (JIANG et al., 2016), o que pode ter acontecido com esses genótipos.

A eficiência de carboxilação, de maneira geral, diminui de acordo com o aumento da incidência de ferrugem, já que está negativamente correlacionada com a incidência de doença. Debona et al. (2014), avaliando as limitações fotossintéticas em folhas de trigo infectadas por *Pyricularia oryzae*, observaram diminuição na eficiência de carboxilação de acordo com o progresso da doença. As maiores eficiências de carboxilação, juntamente com maiores taxas de fotossíntese, foram observadas aos 3 DAI. A maior taxa fotossintética nesse dia é explicada pela maior eficiência de carboxilação, sendo que o principal fator limitante da fotossíntese em cafeeiros não é a resistência estomática e, sim, o processo de carboxilação (DAMATTA, 2004).

O genótipo MG 0580 teve um aumento da eficiência de carboxilação de 30%, ao longo do tempo, comparado aos demais genótipos, podendo ser uma reação de defesa da planta ao patógeno. Programas de melhoramento genético, incluindo o do cafeeiro, podem selecionar genótipos inoculados com *Hemileia vastatrix* que apresentem maior eficiência de carboxilação, podendo exibir rendimentos relativamente altos, mesmo quando cultivados em ambientes que apresentem condições favoráveis para o desenvolvimento da ferrugem (DEBONA et al, 2014).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, os teores de clorofila a, b e total não são bons indicadores de infecção fúngica em café. Resultados semelhantes foram encontrados por Gortari et al. (2017), estudando alterações na fisiologia foliar em álamos infectados com *Melampsora medusae*. A ferrugem do eucalipto não reduziu o nível de clorofila

em nenhum dos clones estudados em vaso, embora houvesse diferença do teor de clorofila entre os clones. Folhas de *Populus cathayana* Rehder infectadas com ferrugem apresentaram menor taxa fotossintética e menor condutância estomática que folhas saudáveis, porém, a concentração de clorofila não foi alterada (ZHANG et al., 2010).

As mudanças fisiológicas induzidas por patógenos biotróficos em plantas são muito complexas e divergentes, sendo dependentes do patógeno, do hospedeiro, da interação entre os dois e do ambiente, podendo variar também com a idade da planta (BERGER et al., 2007). Portanto, investigações cuidadosas de diferentes aspectos são ainda necessárias para se entender as respostas fisiológicas da interação entre as plantas de café e o fungo *Hemileia vastatrix*. Os resultados deste trabalho evidenciam a importância da ferrugem para a cultura do cafeeiro e seu efeito prejudicial na fisiologia foliar de plantas de café.

4 CONCLUSÕES

Os genótipos de café apresentaram diferentes respostas fisiológicas induzidas pelo fungo *Hemileia vastatrix*, ao longo das avaliações. Houve diminuição na fotossíntese líquida, na condutância estomática e na transpiração foliar e aumento do carbono interno em genótipos de café, de acordo com o aumento de incidência da doença.

Os teores de clorofila não foram alterados com a incidência da ferrugem.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. A. et al. Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. **Acta Physiol. Plant**, v.33, p. 1831-1839, 2011.
- BARBIERI JÚNIOR, E. et al. Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tofton 85. **Ciência Rural**, v.42, p.2242-2245, 2012.
- BASSANEZI, R. B. et al. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. **Plant Pathol**, v.50, p. 443-452, 2001.
- BASSANEZI, R. B. et al. Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. **J. Phytopathol**, v.150, p. 37-47, 2002.
- BASSO, M.F. et al. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n.6, p.351-359, 2010.
- BASTIAANS, L. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. **Phytopathology**, v. 81, p. 611-615, 1991.
- BEDENDO, I. Ferrugens. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, p.479-484, 2011.
- BERGER, S. et al. Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A.thaliana*. **J Exp Bot**, v.58, p.797–806, 2007.
- BONFIG, K.B. et al. Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in Arabidopsis leaves. **Planta**, v.225, p.1–12, 2006.
- BOTELHO, C. E. et al. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de café arábica em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 45, n. 12, p. 1404-1411, 2010.
- CAMPBELL, C.L, MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York NY. John Wiley & Sons, 1990.
- CAPUCHO, A.S. et al. Inheritance of coffee leaf rust resistance in Timor Hybrid UFV 443-03. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p. 276-82, 2009.

CARRETERO, R.; BANCAL, M.O; MIRALLES, D. J. Effect of leaf rust (*Puccinia triticina*) on photosynthesis and related processes of leaves in wheat crops grown at two contrasting sites and with different nitrogen levels. **European Journal of Agronomy**, v.35, p.237–246, 2011.

CARVALHO, A. M. et al. Comportamento de cultivares de cafeeiro sob a incidência das doenças da ferrugem e cercosporiose em dois ambientes de cultivo. **Coffee Science**. Lavras, MG. v 12, n.1. p. 100-107, 2017.

CARVALHO, L. C.; CHALFOUN, S. M.; CUNHA, R. L. **Manejo de doenças do cafeeiro**. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (Ed.). **Café arábica: do plantio a colheita**. Lavras: Ed. EPAMIG, v. 1, p. 689-757, 2010.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CURVELO, C.R.S et al. Leaf gas exchange and oxidative stress on cotton plants supplied with silicon and infected by *Ramularia areola*. **Bragantia**, v.72, n.4, p. 346-359, 2013.

DALLAGNOL, L. J.et al. Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. **Austral. Plant Pathol.**, v.40, p. 360-365, 2011.

DAMATTA, F.M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Res**, v.86, p.99-114, 2004.

DAMATTA, F.M. et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p.485-510, 2007.

DEBONA, D. et al.Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, v.104, p.34–39, 2014.

DOMICIANO, G.P. et al. Alteração na fotossíntese de plantas infectadas por patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.17, p.305–339, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. Consórcio brasileiro de pesquisas e desenvolvimento de café. **Catiguá MG1 e Catiguá MG2**: cultivares de café resistentes à ferrugem (S.1), (2004). Folder.

GORTARI, F. et al. Plant–pathogen interactions: leaf physiology alterations in poplars infected with rust (*Melampsora medusae*). **Tree Physiology**, p.1–11, 2017.

GUERRA, A.M.N.M. et al. Capacidade fotossintética de plantas de algodoeiro infectadas por ramulose e supridas com silício. **Bragantia**, v.73, p.50–64, 2014.

GUIMARÃES, P. T. G. et al. Cafeeiro. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG. p. 289-302, 1999.

- HONORATO JUNIOR, J. et al. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.123, p.31–39, 2015.
- JIANG, Y. et al. Scaling of photosynthesis and constitutive and induced volatile emissions with severity of leaf infection by rust fungus (*Melampsora larici-populina*) in *Populus balsamifera* Var. *suaveolens*. **Tree Physiol**, v.38, p.856-872, 2016.
- LOPES, D.B; BERGER, R.D. The effects of rust and anthracnose on the photosynthetic competence of diseased bean leaves. **Phytopathology**, v.91, p.212–220, 2001.
- MANDAL, K. et al. Effect of downy mildew disease on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Plantago ovata* Forsk. **J Plant Dis Protect**, v. 116, p.164–168, 2009.
- PETEK, M.R, SERA, T, FONSECA, I.C.D.B. Prediction of genetic additive values for development of a coffee cultivar with increased rust resistance. **Bragantia**, v. 67(1), p.133–140, 2008.
- PINKARD, E.A, MOHAMMED, C.L. Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. **New Phytol**, v.170, p.119–127, 2006.
- RAMALHO, J. C. et al. Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. **Plant Biology**, v.5 (11), p.631 – 641, 2003.
- RENA, A.B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.26-40, 1985.
- RESENDE, R. S. et al. Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected with *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, v.102, p.892-898, 2011.
- RIOS, J.A. et al. Changes in leaf gas exchange, chlorophyll a fluorescence and antioxidant metabolism within wheat leaves infected by *Bipolaris sorokiniana*. **Appl.Biol**, v.170, p.189–203, 2017.
- ROLFE, S. A., SCHOLLES, J. D. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. **Protoplasma**, v.247, p.163–175, 2010.
- SALUSTIANO, M. E. et al. Variabilidade em dez populações de *Hemileia vastatrix* em relação à germinação e ao comprimento do tubo germinativo em quatro temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, 2008.
- SCHARTE, J; SCHÖN, H; WEIS, E. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. **Plant Cell Environ**, v.28, p.1421–1435, 2005.
- SILVA, F.G. et al. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of eggplant grown under different irrigation depths. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, p. 946-952, 2015.

- SILVA, L. et al. Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.9, p.965-972, 2010.
- SILVA, M.C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Braz J Plant Physiol**, v.18, p.119–147, 2006.
- STANGARLIN, J. R. et al. A Defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46. 2011.
- SWARBRICK, P. J.; SCHULZE-LEFERT, P.; SCHOLES, J.D. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. **Plant Cell Environ**, v.29, p.1061–1076, 2006.
- TATAGIBA, S.D; RODRIGUES, F.A; DAMATTA, F.M. Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence imaging of rice leaves infected with *Monographella albescens*, **Phytopathology**, v.105, p.180–188, 2014.
- TONIUTTI, L. et al. Influence of Environmental Conditions and Genetic Background of *Arabica* Coffee (*C. arabica* L) on Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) Pathogenesis. **Plant Science**, v.8, 2017.
- VARZEA, V.M.P, MARQUES, D.V. **Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance**. In: ZAMBOLIM, L; MACIEL- ZAMBOLIM, E; VÁRZEA, V.M.P (ed) Durable resistance to coffee leaf rust. UFV, Viçosa, p. 53–74, 2005.
- YANG, S. M. et al. Wheat resistance to fusarium head blight is associated with changes in photosynthetic parameters. **Plant disease**, v.100, p. 847–852, 2016.
- ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.41, p.1-8, 2016.
- ZHANG,S. et al. Changes in antioxidante enzyme activities and isozyme profiles in leaves of male and female *Populus cathayana* infected with *Melampsora larici-populina*. **Tree Physiol**, v. 30, p.116–128, 2010.
- ZHAO, D. et al. Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. **Plant Disease**, v.95, p.640–647, 2011.

ARTIGO 2

Análise multivariada das adaptações morfofisiológicas causadas por estresse biótico em genótipos cafeeiros

*Mariana Thereza Rodrigues Viana

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme instrução do Manual de normalização da UFLA.

*Doutora em Fitotecnia, Departamento de Fitotecnia, UFLA. E-mail: marianatriv@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se estudar o comportamento de genótipos de cafeeiros antes e após a inoculação com o patógeno *Hemileia vastatrix*, com base em características morfofisiológicas, utilizando técnicas multivariadas, além de identificar as características que mais contribuem para a divergência genética total dos genótipos. Os dados foram obtidos de um experimento em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas. Foram utilizados 10 genótipos de cafeeiros oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de Café de Minas Gerais. As mudas foram produzidas em viveiro e, após um mês de aclimação em casa de vegetação, foi realizada a inoculação artificial com o fungo *Hemileia vastatrix*. As avaliações anatômicas e fisiológicas foram realizadas em dois tempos, 1 DAI (dia antes da inoculação) e 160 DAPI (dias após a inoculação). Também foi realizada análise da abertura ostiolar em microscópio eletrônico de varredura em 1 DAI. Além disso, avaliou-se a severidade de doença a partir do aparecimento dos primeiros sintomas, por meio do cálculo da área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD). Foi realizada ANOVA para as características de abertura ostiolar e AACPSD e, posteriormente, o teste Scott-Knott para o agrupamento das médias. O método multivariado com base nas variáveis canônicas foi utilizado para o estudo da divergência e agrupamento dos genótipos (método K-means), com base nas características morfofisiológicas avaliadas, antes da inoculação, a 1 DAI (dia antes da inoculação) e aos 160 DAPI (dias após a inoculação). A contribuição relativa de cada variável para a divergência genética foi obtida pelo método proposto por Singh (1981). Todas as análises foram realizadas no aplicativo computacional Genes. Houve diferença significativa, a 1% de probabilidade, para as características abertura do ostíolo e AACPSD, e os genótipos foram separados em grupos distintos pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott. Houve formação de diferentes grupos pelo método K-means, com base em características morfofisiológicas. Isso mostra que existe variabilidade genética entre os genótipos de café avaliados antes e após a inoculação com o patógeno. As características que mais contribuíram para a divergência genética total dos genótipos antes e após a inoculação foram o diâmetro de vasos do xilema e a condutância estomática, e as que menos contribuíram foram a espessura da epiderme adaxial e a razão de carboxilação. Conclui-se que a inoculação com o patógeno da ferrugem *Hemileia vastatrix* ocasionou uma mudança dos genótipos de café com base em características morfofisiológicas.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Hemileia vastatrix*. Variáveis canônicas. Ferrugem do café.

1 INTRODUÇÃO

O principal patógeno responsável pela redução de produtividade na cultura do cafeeiro é o fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*, que depende dos tecidos da planta de café para sua sobrevivência e reprodução (SILVA et al., 2006) e, em condições favoráveis, seus danos podem ocasionar perdas de 30% a 50% da produção (ZAMBOLIM, 2016). Apesar de já existirem no mercado cultivares resistentes ao fungo, é preciso um contínuo trabalho de seleção de progênies (CARVALHO et al., 2017), visto que a durabilidade da resistência das cultivares atuais é difícil de ser prevista, tendo algumas já sido quebradas por novas raças fisiológicas do patógeno (CAPUCHO et al., 2009).

O estresse biótico ocasionado em plantas consiste em alterações fisiológicas, estruturais e bioquímicas em resposta, principalmente, ao ataque de patógenos (HUSSAIN, 2010). Essas respostas podem ser por meio de aclimações rápidas ou adaptações particulares a longo prazo, como, por exemplo, modificações no tamanho e na espessura de folhas e na densidade de estômatos (CHATTOPADHYAY et al., 2011). A resistência das plantas aos patógenos é determinada por fatores genéticos e, em algumas de suas expressões, é influenciada pelo ambiente e também pelas interações patógeno-hospedeiro (SAMIYARSI; JUWARNO; MULJOVATI, 2018).

Para reconhecer o impacto do estresse biótico em plantas é importante entender a natureza das interações patógeno-hospedeiro (PANDEY et al., 2017), considerando a possível diversidade de características anatômicas e fisiológicas nas diferentes cultivares dentro da espécie (LOURENÇO et al., 2011). A combinação de características estruturais e reações bioquímicas empregadas nos processos de defesa das plantas é essencial para a sua manutenção no ecossistema, em função das adversidades e invasões a que estão submetidas (XU et al., 2011). Alguns autores, em seus trabalhos, têm utilizado essas características a fim de selecionar genótipos resistentes às principais doenças, principalmente nas fases iniciais de programas de melhoramento (CHATTOPADHYAY et al., 2011; ALVES et al., 2011; PATOLE et al., 2017; TRIVEDI et al., 2014; GORTARI et al., 2017).

Barreiras físicas e químicas pré-formadas são frequentemente consideradas a primeira linha de defesa em plantas contra um patógeno (CHENG et al., 2012). Menores densidades estomáticas e maiores espessuras de parênquima paliçádico e epiderme foram observadas em folhas de bananeira após a infecção com o patógeno da sigatoka amarela (ARAUJO et al., 2014). A densidade e o comprimento estomático têm relação com o desenvolvimento e a esporulação do míldio (*Peronospora belbahrii*) em espécies de manjeriço (HOMA et al.,

2016). A taxa fotossintética líquida, a transpiração foliar e a condutância estomática foram negativamente correlacionadas com o número de lesões da antracnose em plantas de açaí (CASTRO et al., 2017). Assim, o estudo das estruturas anatômicas pré-formadas da planta, bem como das características fisiológicas, é de fundamental importância para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência aos patógenos (XU et al., 2011, BERGER et al., 2007; MAHAJAN; DHILLON; BRARDWAJ, 2017).

O sucesso de um programa de melhoramento genético depende, entre outros fatores, da disponibilidade de populações que apresentem variabilidade genética para as características sob seleção (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). Muitos pesquisadores têm utilizado características morfológicas, agronômicas e fisiológicas, a fim de selecionar genótipos visando futuros cruzamentos, por meio de técnicas multivariadas (GUEDES et al., 2013; BENITEZ et al., 2011; AZEVEDO et al., 2015; MARIOT; BARBIERI, 2010). Entretanto, o efeito que um estresse biótico pode causar na divergência genética total de genótipos ainda não foi estudado, visto que, embora alguns mecanismos de resposta e defesa tenham sido elucidados, o comportamento fisiológico de plantas expostas ao estresse biótico ainda é um grande desafio para a agricultura (REJEB; PASTOR; MAUCH-MANI, 2014).

Diante do exposto, objetivou-se estudar o comportamento de genótipos de cafeeiros antes e após a inoculação com o patógeno *Hemileia vastatrix*, com base em características morfofisiológicas, utilizando técnicas multivariadas, além de identificar as características que mais contribuem para a divergência genética total dos genótipos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das sementes para a formação de mudas

O Banco Ativo de Germoplasma de Café do Estado de Minas Gerais pertence à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) e foi instalado, em 2004, na Fazenda Experimental de Patrocínio, localizada na região do Alto Paranaíba, situada a 18°59'26" de latitude sul e 48°58'9,5" de longitude oeste à altitude aproximada de 1.000 metros. O solo é do tipo Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico. O relevo da área do banco é de topografia plana com ligeira inclinação. O clima local é classificado como mesotérmico subtropical temperado, com chuvas de verão, inverno seco e verão quente (Wca), segundo Köppen (1948). O banco, atualmente, conta com aproximadamente 1.500 genótipos e apresenta grande variabilidade genética, constituída de fontes de resistência a pragas e doenças do cafeeiro.

No presente trabalho foram selecionados, do Banco Ativo de Germoplasma de Café da Epamig, oito genótipos de *Coffea arabica* do cruzamento entre Dilla & Alghe e Híbridos de Timor, do grupo dos genótipos resistentes à ferrugem. Além disso, foram utilizadas duas cultivares, sendo uma considerada resistente, Catiguá MG 3 (EPAMIG, 2004) e outra suscetível, Topázio MG 1190 (CARVALHO et al., 2017) (Tabela 1).

Tabela 1 - Genótipos selecionados do Banco Ativo de Germoplasma de Minas Gerais, em Patrocínio, MG.

Nº	Genótipo	Genealogia
1	MG 0579	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-01
2	MG 0580	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-03
3	MG 0581	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-06
4	MG 0582	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-07
5	MG 0583	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-09
6	MG 0587	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-25
7	MG 0588	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-30
8	MG 0591	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-48
9	Catiguá MG3	Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 440-10
10	Topázio MG1190	Catuaí x Mundo Novo

Fonte: Da autora (2018).

2.2 Produção de mudas, instalação do experimento e inoculação

As mudas foram produzidas em viveiro com 30% de sombreamento e irrigação controlada. A semeadura foi feita em sacos plásticos de polietileno, contendo substrato padrão (composto de 700 L de solo e 300 L de esterco de curral por metro cúbico de mistura, sendo adicionados 5 kg de superfosfato simples e 0,5 kg de cloreto de potássio), de acordo com Guimarães et al. (1999). Cada saco plástico recebeu três sementes. Quando as mudas apresentavam-se no estágio de folhas cotiledonares, foi realizado um desbaste, deixando-se apenas uma muda por saquinho.

Posteriormente, foram selecionadas as mudas mais vigorosas e uniformes, com três pares de folhas verdadeiras e, então, levadas para casa de vegetação, onde ocorreu a aclimação. Durante todo o período experimental, as mudas foram irrigadas periodicamente, com a utilização de um sistema de irrigação com nebulizador de baixa vazão, e controle de temperatura (23 °C) e da umidade relativa do ar (70%). As mudas receberam adubações complementares de acordo com recomendação técnica para a cultura (GUIMARÃES et al., 1999).

Após um mês de aclimação, as plantas (com aproximadamente quatro pares de folhas verdadeiras) foram inoculadas artificialmente. Os esporos de *H. vastatrix* foram obtidos a partir de folhas naturalmente infectadas de plantas de cafeeiro no campo, os quais foram coletados por meio de raspagem das pústulas e acondicionados em microtubos, protegidos da luz. Para a inoculação artificial das plantas, foi preparada uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^5 urediniósporos mL⁻¹ ágar-água (0,2% p/v), contendo Tween 20 (0,05% v/v) (SALUSTIANO et al., 2008). Posteriormente, a solução foi pulverizada em toda a muda na parte abaxial das folhas, com o auxílio de um pulverizador manual. Todas as mudas foram submetidas a uma câmara úmida na própria casa de vegetação, no escuro, pelo período de 72 horas (MONTEIRO et al., 2016). O delineamento adotado foi em blocos casualizados, com três repetições, tendo cada parcela sido constituída de três plantas.

2.3 Dados climatológicos

No interior da casa de vegetação foi instalado um sensor de temperatura e umidade relativa do ar modelo Onset HOBO datalogger. Os dados foram coletados e armazenados pelo datalogger em todo o período experimental.

As datas de avaliação foram 09/05/2017 (1 dia antes da inoculação – 1 DAI) e 18/10/2017 (160 dias após a inoculação – 160 DAPI).

2.4 Análise de severidade da ferrugem

Em cada muda, foram realizadas cinco avaliações com intervalos de sete dias, após o aparecimento dos primeiros sintomas, a fim de avaliar a severidade da doença. Utilizou-se a escala diagramática proposta por Cunha et al. (2001). Em seguida, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), conforme Shaner e Finney (1977).

$$AACPSD = \sum_i^{n-1} \left[\frac{(x_i + x_{i+1})}{2} \right] * t$$

em que n é o número de avaliações, x é a severidade da doença, i é o número de avaliações e t é o intervalo de tempo entre duas avaliações consecutivas.

2.5 Avaliações em microscópio eletrônico de varredura

Foi coletada no início da manhã, quando se esperava que os estômatos estivessem abertos, uma folha de cada genótipo em cada bloco, antes da inoculação, para avaliação da abertura do ostíolo em microscópio eletrônico de varredura (MEV). As amostras foram cortadas em pedaços com, no máximo, 2 cm de largura e altura máxima de 3 cm. Os espécimes obtidos foram imersos em solução fixativa (Karnovsky's modificado), pH 7,2, por um período de 24 horas, lavados em tampão cacodilato de sódio 0,05M e desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico CPD 050 (BalTec) para completar a secagem, montado em suportes de alumínio (stubs) com fita de carbono dupla face colocada sob uma película de papel alumínio e coberto com ouro (aparelho evaporador de ouro Sputtering SCD 050 Bal-Tec). Posteriormente, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP (Carl Zeiss). Foram fotografados seis campos em cada stub, em aumentos de 3.000 x, sendo os campos considerados como repetição. As imagens foram analisadas em software para análise de imagens UTHSCSA-Imagetool.

2.6 Avaliações fisiológicas

As análises fisiológicas foram realizadas em dois tempos de avaliação, sendo eles 1 DAI (1 dia antes da inoculação), em folhas do terceiro par completamente expandidas antes da inoculação do patógeno e 160 DAPI (160 dias após a inoculação) na primeira folha completamente expandida após o estresse da inoculação.

2.6.1 Trocas gasosas

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas no período da manhã entre 9 e 11 horas, com o auxílio de um analisador de gás por infravermelho (IRGA; Li-Cor Li-6400XT). Sua câmara de LED foi programada para uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram determinados os valores de fotossíntese líquida ($A - \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração ($E - \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática ($g_s - \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), carbono interno ($C_i - \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), razão de carboxilação (C_i/C_a), eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) (SILVA et al., 2010) e eficiência intrínseca de uso da água ($E_i\text{UA}$) (A/g_s) (SILVA et al., 2013).

2.6.2 Índice de clorofila

A determinação indireta dos teores relativos das clorofilas a e b foi obtida por meio do medidor portátil de clorofila ClorofiLOG (Falker Automação Agrícola, Brasil) que fornece valores denominados índices de clorofila Falker (ICF) proporcionais à absorbância das clorofilas. O ClorofiLOG constitui um equipamento eficaz na determinação indireta dos teores relativos das clorofilas a, b e total (BARBIERI JÚNIOR et al., 2012).

2.7 Avaliações anatômicas

Foram realizadas duas coletas de folhas em diferentes épocas, sendo elas 1 DAI, folhas do terceiro par completamente expandidas antes da inoculação do patógeno e 160 DAPI, a primeira folha completamente expandida após o estresse da inoculação. Em cada época foi coletada uma folha de uma muda por parcela, sendo as duas coletas realizadas na mesma planta. As folhas coletadas foram fixadas em álcool 70% ($v v^{-1}$) (JOHANSEN, 1940) e, após 72 horas,

colocadas em nova solução de álcool 70% ($v v^{-1}$) visando à conservação do material, em temperatura ambiente, até a data das análises.

As secções paradérmicas foram obtidas à mão livre, com uso de lâmina de aço. Posteriormente, foram submetidas à clarificação com hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo), tríplice lavagem em água destilada e coloração com solução de safranina 1%, sendo posteriormente montadas em lâminas semipermanentes com glicerol 50% ($v v^{-1}$) (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Para as secções transversais o material vegetal foi submetido a concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), em intervalos de 2 horas. As amostras foram incorporadas em historesina de acordo com as instruções do fabricante (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), obtendo-se secções (8 μ m de espessura) com o auxílio de um micrótomo rotativo semiautomatizado modelo MRP 2015 da marca Lupetec Tecnologia Aplicada (Lupe Indústria Tecnológica de Equipamentos para Laboratório, Brasil). As secções foram coradas com azul de toluidina a 1% ($m v^{-1}$) e montadas com verniz vitral (PAIVA et al., 2006).

Foram preparadas três lâminas por folha e avaliados três campos por lâmina. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico, modelo Red 200, marca Kasvi/Motic, acoplado à câmera digital modelo D-Moticam 5MP marca Motic. Posteriormente, as imagens foram analisadas em software para análise de imagens UTHSCSA-Imagetool. A característica espessura da cutícula da face abaxial foi fotografada utilizando-se a objetiva de aumento de 40x e, para as demais características, utilizou-se a objetiva de aumento de 20x.

Nas secções paradérmicas foram avaliados o número de estômatos (ne) e o número de células epidérmicas (ncl), que foram utilizadas para mensurar as variáveis frequência estomática ($(frq=ne/ncl) * 100$); densidade estomática ($den=ne/mm^2$) e índice estomático ($ies=(ne/(ncl+ne)) * 100$); diâmetro polar dos estômatos ($dp- \mu m$) e diâmetro equatorial dos estômatos ($de- \mu m$) utilizados para a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial (dp/de).

As características avaliadas nas secções transversais foram espessura da cutícula da face abaxial ($eca- \mu m$); espessura da epiderme da face abaxial ($eab- \mu m$); espessura da epiderme da face adaxial ($ead- \mu m$); espessura do parênquima paliçádico ($ppa- \mu m$); espessura do parênquima esponjoso ($epp- \mu m$); espessura do limbo foliar ($lim- \mu m$), que compreende a soma de todos os tecidos entre as cutículas; número de vasos de xilema (nvx); diâmetro de vasos do xilema ($dvx- \mu m$) e espessura do floema ($efl- \mu m$).

2.8 Análise estatística

2.8.1 Análise univariada

Inicialmente foi realizado um teste de Lilliefors, para verificar o atendimento às pressuposições de normalidade dos erros. Posteriormente foi realizada uma análise de variância para os dados de AACPSD e abertura do ostíolo, pelo teste F e um teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para o agrupamento das médias.

2.8.2 Análise multivariada

O método multivariado com base nas variáveis canônicas foi utilizado para identificação e agrupamento dos genótipos com base nas características morfofisiológicas avaliadas, antes da inoculação 1 DAI e aos 160 DAPI. Utilizaram-se as matrizes de variâncias e covariâncias fenotípicas e residuais entre os caracteres. Para a realização da análise, as médias originais dos caracteres são transformadas por um processo de condensação pivotal, originando novas variáveis que se caracterizam por apresentar covariâncias residuais nulas e variâncias residuais iguais a um. O número de variáveis canônicas é igual ou menor ao valor mínimo entre o número de caracteres e o número de graus de liberdade de tratamentos. Um valor numérico (score) de cada variável é calculado para cada um dos genótipos. Com estes scores constrói-se um gráfico de dispersão que permite a visualização da divergência genética (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012), sendo, posteriormente, aplicado o método não hierárquico K-means para o agrupamento dos genótipos. A contribuição relativa de cada variável para a divergência genética foi obtida pelo método proposto por Singh (1981), o qual se baseia na partição do total das estimativas das distâncias de Mahalanobis (D^2). Todas as análises foram realizadas no programa computacional GENES (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS

3.1 Dados climáticos

A temperatura média do ar no dia 09/05, 1 DAI, foi de, aproximadamente, 17 °C, com umidade relativa do ar média de 80%. Já aos 160 DAPI (18/10), a temperatura média do ar era de 25 °C com umidade relativa do ar média de 60%.

3.2 Análise univariada

3.2.1 Severidade de ferrugem

Houve necessidade de transformar os dados após a verificação de não normalidade, de acordo com o teste de Lilliefors. Foi calculada a raiz quadrada mais uma constante 1 de cada observação para a AACPSD.

Houve diferença significativa ($p < 0,01$) para a severidade de doença (AACPSD) entre os genótipos avaliados. Os genótipos foram divididos em quatro grupos distintos. O genótipo Topázio MG 1190, considerado suscetível, apresentou a maior severidade de doença, seguido pelo genótipo MG 0582 e Catiguá MG 3. Os demais genótipos foram agrupados juntos, sendo considerados resistentes à ferrugem (Tabela 2).

Tabela 2 - Teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade, para a AACPSD para os 10 genótipos avaliados.

Genótipos	AACPSD	
MG 0579	0,19	d
MG 0580	0,00	d
MG 0581	0,00	d
MG 0582	49,75	b
MG 0583	0,00	d
MG 0587	0,00	d
MG 0588	0,00	d
MG 0591	0,10	d
Catiguá MG 3	33,72	c
Topázio MG 1190	85,22	a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. AACPSD: área abaixo da curva de progresso de severidade da doença.
Fonte: Da autora (2018).

3.2.2 Avaliações em microscópio eletrônico de varredura

Na análise de variância foi observada diferença significativa ($p < 0,01$) entre os genótipos, pelo teste F, quanto à abertura do ostíolo.

Os genótipos foram separados em três grupos distintos, de acordo com a abertura do ostíolo, tendo o genótipo MG 0582 apresentado a maior média de abertura de ostíolo, seguido dos genótipos MG 0579, MG 0580, MG 0587 e Topázio MG 1190. Os demais genótipos apresentaram as menores médias de abertura de ostíolo (Tabela 3).

Tabela 3 - Teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade, para a abertura do ostíolo para os 10 genótipos avaliados.

Genótipos	Abertura do ostíolo (μm)	
MG 0579	1,76	b
MG 0580	1,82	b
MG 0581	1,30	c
MG 0582	3,02	a
MG 0583	1,09	c
MG 0587	2,01	b
MG 0588	1,18	c
MG 0591	1,38	c
Catiguá MG 3	1,36	c
Topázio MG 1190	1,75	b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Da autora (2018).

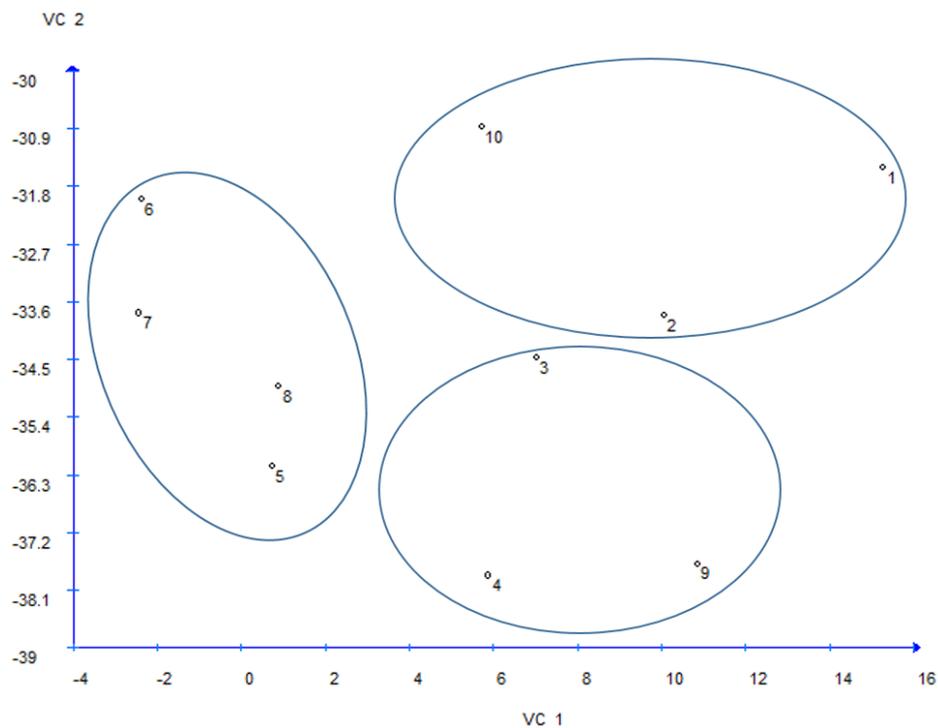
3.3 Análise multivariada

As estimativas das variâncias acumuladas nas duas primeiras variáveis canônicas, referentes às avaliações 1 DAI e 160 DAPI, tanto para características anatômicas como fisiológicas, estão apresentadas nas Figuras 1, 2, 3 e 4. Para as características anatômicas 1 DAI e 160 DAPI, as duas primeiras variáveis canônicas (VC1 e VC2) explicam 83,13% e 90,47% da variação total disponível, respectivamente. Já para as características fisiológicas 1 DAI e 160 DAPI, as duas primeiras variáveis canônicas (VC1 e VC2) explicam 77,54% e 86,56% da variação total disponível, respectivamente.

3.3.1 Variáveis canônicas

Nota-se, pela Figura 1, que houve a formação de três grupos de genótipos com base nas características anatômicas foliares 1 DAI, quando se aplicou o método K-means, sendo o grupo I formado pelos genótipos MG 0579, MG 0580 e Topázio MG 1190, o grupo II formado pelos genótipos MG 0581, MG 0582 e Catiguá MG 3 e o grupo III formado pelos genótipos MG 0583, MG 0587, MG 0588 e MG 0591.

Figura 1 - Gráfico de dispersão de 10 genótipos avaliados com base em características anatômicas 1 DAI (dia antes da inoculação) com o fungo *Hemileia vastatrix*, em relação aos escores das duas primeiras variáveis canônicas (VC1-71,02% e VC2 - 83,13%) e agrupados de acordo com o método K-means.

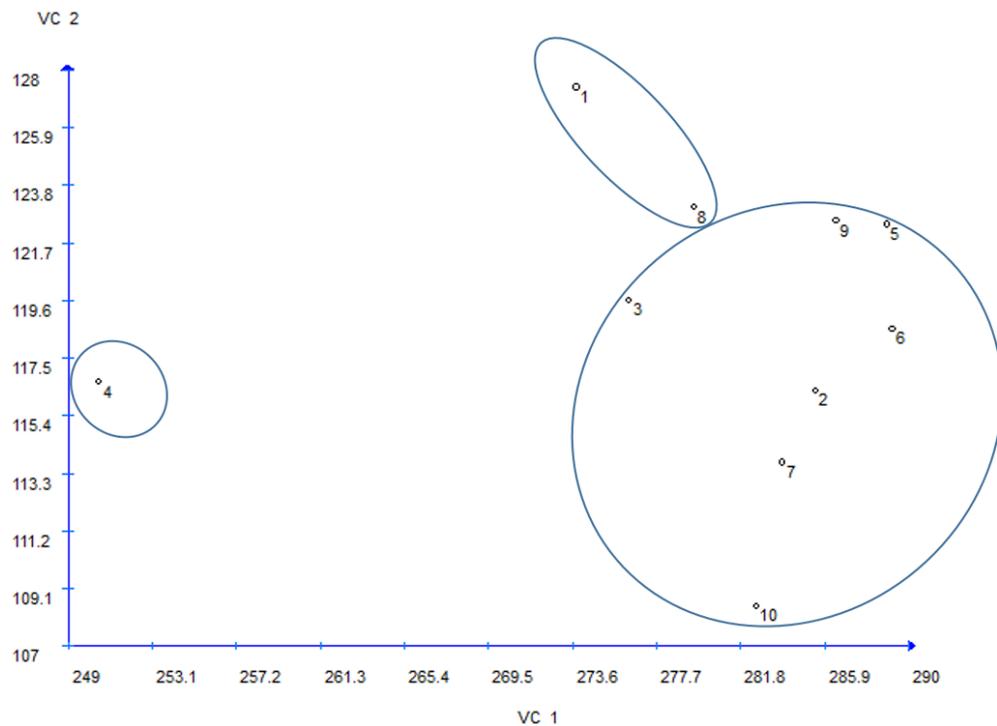


Legenda: 1- MG 0579; 2- MG 0580; 3- MG 0581; 4- MG 0582; 5- MG 0583; 6- MG 0587; 7- MG 0588; 8- MG 0591; 9- Catiguá MG3; 10- Topázio MG 1190.

Fonte: Da autora (2018).

Aos 160 DAPI, os genótipos se agruparam de forma diferente com base nas características anatômicas foliares pelo método K-means, tendo também sido formados três grupos. O grupo I era formado pelos genótipos MG 0579 e MG 0591, o grupo II pelos genótipos MG 0580, MG 0581, MG 0583, MG 0587, MG 0588, Catiguá MG 3 e Topázio MG 1190; já o genótipo MG 0582 ficou isolado no grupo III. Embora tenha havido separação de grupos, 70% dos genótipos ficaram alocados em um mesmo grupo (Figura 2).

Figura 2 - Gráfico de dispersão de 10 genótipos avaliados com base em características anatômicas 160 DAPI (dias após a inoculação) com o fungo *Hemileia vastatrix*, em relação aos escores das duas primeiras variáveis canônicas (VC1-74,01% e VC2 – 90,47%) e agrupados de acordo com o método K-means.

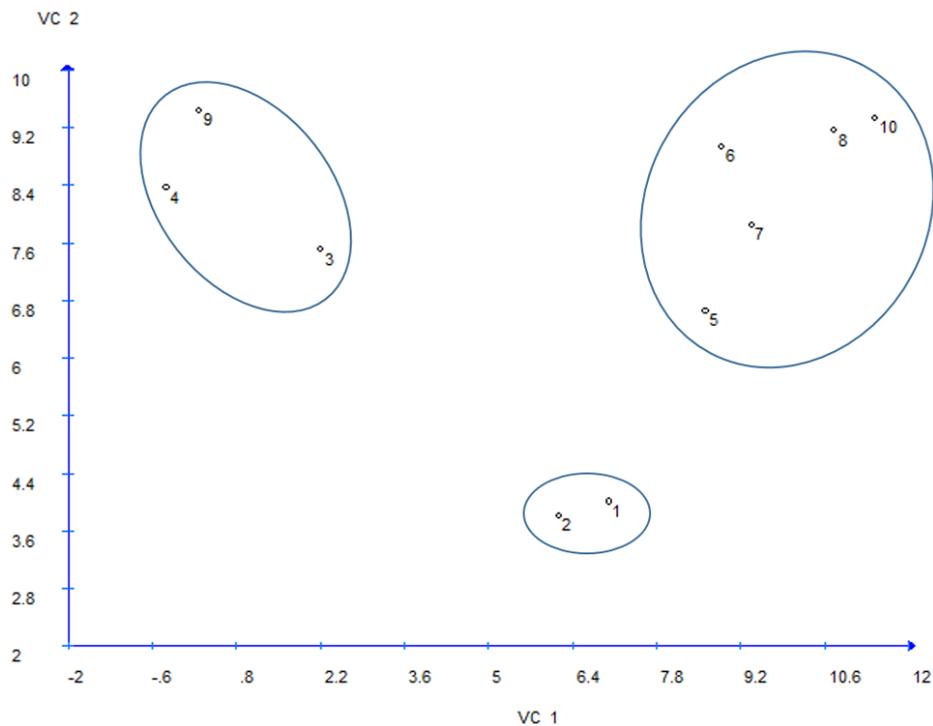


Legenda: 1- MG 0579; 2- MG 0580; 3- MG 0581; 4- MG 0582; 5- MG 0583; 6- MG 0587; 7- MG 0588; 8- MG 0591; 9- Catiguá MG3; 10- Topázio MG 1190.

Fonte: Da autora (2018).

Com relação às características fisiológicas avaliadas, houve a formação de três grupos 1 DAI quando se aplicou o método K-means, sendo o grupo I composto pelos genótipos MG 0581, MG 0582 e Catiguá MG 3; o grupo II composto por MG 0579 e MG 0580 e o grupo III composto pelos genótipos MG 0583, MG 0587, MG 0588, MG 0591 e Topázio MG 1190 (Figura 3). Os genótipos foram agrupados de forma semelhante antes da inoculação (1 DAI), com base nas características anatômicas e fisiológicas, sendo que apenas o genótipo Topázio MG 1190 teve um agrupamento diferente. Anatomicamente, ele foi agrupado com os genótipos MG 0579 e MG 0580 (Figura 1) e fisiologicamente foi agrupado com os genótipos MG 0583, MG 0587, MG 0588 e MG 0591 (Figura 3).

Figura 3 - Gráfico de dispersão de 10 genótipos avaliados com base em características fisiológicas 1 DAI (dia antes da inoculação) com o fungo *Hemileia vastatrix*, em relação aos escores das duas primeiras variáveis canônicas (VC1- 62,74% e VC2 - 77,54%) e agrupados de acordo com o método K-means.

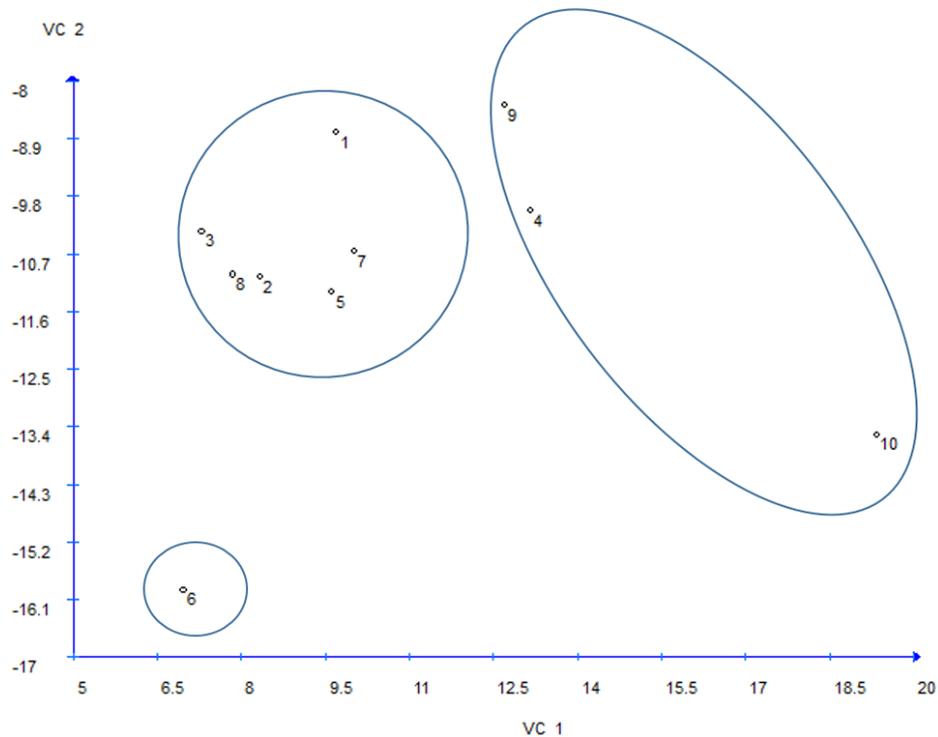


Legenda: 1- MG 0579; 2- MG 0580; 3- MG 0581; 4- MG 0582; 5- MG 0583; 6- MG 0587; 7- MG 0588; 8- MG 0591; 9- Catiguá MG3; 10- Topázio MG 1190.

Fonte: Da autora (2018).

Aos 160 DAPI, os genótipos formaram três grupos distintos com base nas características fisiológicas pelo método de K-means, tendo o grupo I sido formado pelos genótipos MG 0582, Catiguá MG 3 e Topázio MG 1190 e o grupo II formado pelos genótipos MG 0579, MG 0580, MG 0581, MG 0583, MG 0588 e MG 0591. O genótipo MG 0587 ficou isolado no grupo III (Figura 4). Nota-se que 60% dos genótipos ficaram alocados em um mesmo grupo.

Figura 4 - Gráfico de dispersão de 10 genótipos avaliados com base em características fisiológicas aos 160 DAPI (dias após a inoculação) com o fungo *Hemileia vastatrix*, em relação aos escores das duas primeiras variáveis canônicas (VC1-86,56% e VC2- 86,56%) e agrupados de acordo com o método K-means.



Legenda: 1- MG 0579; 2- MG 0580; 3- MG 0581; 4- MG 0582; 5- MG 0583; 6- MG 0587; 7- MG 0588; 8- MG 0591; 9- Catiguá MG3; 10- Topázio MG 1190.

Fonte: Da autora (2018).

3.3.2 Importância de caracteres

As características anatômicas que mais contribuíram para a divergência dos genótipos antes de serem inoculados (1 DAI) foram o LIM (28, 41%), PPA (20, 44%) e DVX (11, 44%), totalizando mais de 60% da variação total, e as características que menos contribuíram foram DE (0,08%), EAD (0,20%) e DP/DE (0,75%) (Tabela 4). Após a inoculação com o patógeno *Hemileia vastatrix* (160 DAPI), as características anatômicas que mais contribuíram para a divergência dos genótipos foram FLO (19,08%), DVX (16,52%) e DP/DE (14,38%), totalizando 50% da variação total, e as características que menos contribuíram foram NVX (0,37%), FRQ (0,82%) e EAD (1,56%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Contribuição relativa das variáveis anatómicas foliares para os 10 genótipos de café avaliados 1 DAI e 160 DAPI, pelo método proposto por SINGH (1981).

Variável*	S _{.j} ¹ (%) 1 DAI	S _{.j} ¹ (%) 160 DAI
LIM	28,413	1,983
PPA	20,443	2,491
DVX	11,441	16,521
FLO	7,491	19,076
FRQ	7,126	0,819
IES	6,309	4,395
EAB	4,895	4,738
EPE	3,796	10,003
ECA	3,229	2,997
DP	2,177	4,182
DEN	1,402	4,375
NVX	1,211	0,366
MES	1,043	7,292
DP/DE	0,745	14,381
EAD	0,197	1,556
DE	0,076	4,820

¹S_{.j}: contribuição da variável x para o valor da distância de *Mahalanobis* entre os genótipos i e i', *lim: espessura do limbo; ppa: espessura do parênquima paliçádico; dvx: diâmetro de vasos do xilema; flo: espessura do floema; frq: frequência estomática; ies: índice estomático; eab: espessura da epiderme da face abaxial; epe: espessura do parênquima esponjoso; eca: espessura da cutícula da face abaxial; dp: diâmetro polar do estômato; den: densidade estomática; nvx: número de vasos do xilema; mes: espessura do mesofilo; dp/dq: diâmetro polar/diâmetro equatorial; ead: espessura da epiderme da face adaxial; de: diâmetro equatorial do estômato.

Fonte: Da autora (2018).

As características fisiológicas que mais contribuíram para a divergência genética dos genótipos antes de serem inoculados (1 DAI) foram gs (45, 78%), E (29, 19%) e A (11, 56%), totalizando mais de 70% da variação total. As que menos contribuíram foram cl_a (0,68%), Ci (0,96%) e Ci/Ca (1,32%) (Tabela 5). Aos 160 DAPI, as características fisiológicas que mais contribuíram para a divergência dos genótipos foram gs (58,45%), A/Ci (18,26%) e E (16,74%), tendo essas três características juntas totalizado mais de 90% da variação total. Já as que menos contribuíram foram Cl_b (0,25%), EiUA (0,56%) e Ci/Ca (0,78%) (Tabela 5).

Tabela 5 - Contribuição relativa das variáveis fisiológicas para os 10 genótipos de café avaliados 1 DAI e 160 DAPI, pelo método proposto por SINGH (1981).

Variáveis*	S.j ¹ (%) 1 DAI	S.j ¹ (%) 160 DAPI
Gs	45,784	58,451
E	29,189	16,738
A	11,560	1,304
Cl_b	4,666	0,246
A/Ci	2,938	18,261
EiUA	2,900	0,562
Ci/Ca	1,317	0,775
Ci	0,963	1,941
Cl_a	0,679	1,718

¹S. j: contribuição da variável x para o valor da distância de *Mahalanobis* entre os genótipos i e i', *gs: condutância estomática; E: transpiração foliar; A: taxa fotossintética líquida; Cl_b: índice de clorofila b; A/Ci: eficiência instantânea de carboxilação; EiUA: eficiência intrínseca de uso da água; Ci/Ca: razão de carboxilação; Ci: carbono interno; Cl_a: índice de clorofila a.

Fonte: Da autora (2018).

4 DISCUSSÃO

O genótipo Catiguá MG 3, considerado resistente à ferrugem, se mostrou tolerante ao patógeno, apresentando severidade de doença em nível intermediário (PETEK; SERA; FONSECA, 2008), quando comparado aos demais genótipos. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos de campo nos quais se avaliou a severidade de ferrugem em cultivares de café resistentes e suscetíveis nas regiões cafeeiras de Minas Gerais (CARVALHO et al., 2017). Já a cultivar Topázio MG 1190 apresentou alta severidade de ferrugem, confirmando a alta suscetibilidade ao patógeno (CARDOSO et al., 2016).

O genótipo MG 0582, derivado do Híbrido de Timor, que é considerado a principal fonte de genes de resistência à ferrugem (SILVA et al., 2018), também apresentou severidade de doença em nível intermediário. Incidência e severidade de doença em níveis intermediários podem indicar resistência horizontal, sendo que, em condições naturais de epidemia, a severidade é o componente que melhor discrimina níveis de resistência horizontal (BOTELHO et al., 2010).

A maior abertura ostiolar foi observada no genótipo MG 0582, quando comparado aos demais genótipos, sendo também a segunda maior severidade de doença. Dessa forma, a suscetibilidade nesse genótipo pode estar associada a fatores estruturais do hospedeiro, visto que a hifa de infecção do fungo penetra pela abertura ostiolar. Além disso, o fungo *Hemileia vastatrix* apresenta hábito de esporulação pelos estômatos (BEDENDO et al., 2011). Maior abertura de ostíolo foi observada em genótipos de amendoim suscetíveis ao fungo biotrófico da mancha angular (*Phaeoisariopsis personata*) (JYOSTHNA et al., 2004) e cacau suscetível ao fungo *Ceratobasidium theobromae* (SUSILO et al., 2017). Para os demais genótipos, de acordo com os resultados apresentados, não houve relação entre severidade de doença e abertura ostiolar. Este resultado corrobora o relato de Lima; Lopes e Café-Filho (2010) que, estudando genótipos de pimentão, não observaram correlação entre características de abertura ostiolar e resistência ao oídio, descartando a possibilidade de maior severidade de doença estar correlacionada com a maior abertura do ostíolo.

A viabilidade da utilização das variáveis canônicas está restrita à concentração alta da variabilidade disponível entre as primeiras variáveis canônicas, a qual é referenciada por muitos autores, citados por Cruz, Regazzi e Carneiro (2012), como acima de 70% a 80%. Neste trabalho, as duas primeiras variáveis canônicas explicam mais de 70% da variação total disponível e, dessa forma, é possível explicar de maneira satisfatória a variabilidade

manifestada entre os genótipos considerados nesta avaliação, permitindo representá-los em um gráfico de dispersão bidimensional (BENITEZ et al., 2011).

O método K-means é um procedimento para estudar a divergência genética entre acessos e cultivares que tem sido utilizado por diversos autores (SARKAR et al., 2011; MEIRMANS, 2012), inclusive na análise de genótipos café no intuito de formar aglomerados menos heterogêneos em estudos com amplo número de genótipos e características (SOBREIRA et al., 2016). Embora o café apresente base genética estreita (SETOTAW et al., 2013), as formações de diferentes grupos pelo método K-means com base em características morfofisiológicas mostraram que existe variabilidade genética entre os genótipos de café avaliados (Figuras 1, 2, 3 e 4). Quando a população apresenta base genética estreita torna-se importante identificar grupos de progênies divergentes geneticamente para efetuar cruzamentos controlados, visando ampliar a variação genética disponível nestes ensaios, de acordo com as características de estudo (SILVA et al., 2012).

Os genótipos MG 0579 e MG 0591 e o MG 0588 e MG 0581 foram alocados no mesmo grupo, com base nas características morfofisiológicas aos 160 DAPI (Figuras 2 e 4). Guedes et al. (2013), avaliando as características morfológicas e agrônômicas desses genótipos em campo, observaram que eles foram agrupados da mesma forma, reafirmando, assim, sua similaridade.

Embora exista divergência entre os genótipos avaliados após o estresse ocasionado pela inoculação, a maioria deles apresentou o mesmo comportamento com base nas características anatômicas (70%) e fisiológicas (60%). O genótipo MG 0582 ficou isolado em um grupo após a inoculação, de acordo com as características anatômicas, se diferenciando dos demais genótipos que apresentaram severidade de doença (Figura 2). É possível que o genótipo MG 0582 tenha desenvolvido mecanismos estruturais que auxiliem no combate ao patógeno e na recuperação da planta, porém, pouco se sabe sobre mecanismos estruturais desenvolvidos pelas plantas para se reestabelecer após um estresse biótico (CRISP et al., 2016).

Aos 160 DAPI, os genótipos que apresentaram sintomas da doença (MG 0582, Catiguá MG 3 e Topázio MG 1190) ficaram em um mesmo grupo em relação às características fisiológicas. Os fungos biotróficos colonizam apenas tecidos vivos e, dessa forma, ocasionam danos e modificações na fisiologia do hospedeiro, seja diretamente, via secreção de produtos químicos, ou indiretamente, por meio de respostas induzidas ocasionadas nas plantas (ALVES et al., 2011; DEBONA et al., 2014). A diminuição na eficiência fotossintética e limitações de condutância estomática e mesofílica, bem como alterações bioquímicas, são os principais efeitos causados por patógenos foliares (BERMÚDEZ-CARDONA; WORDEL-FILHO; RODRIGUES, 2015).

A característica anatômica diâmetro de vasos do xilema está entre as três características que mais contribuíram para a divergência dos genótipos, tanto em 1 DAI como aos 160 DAPI. A capacidade de uma planta de absorver e transportar água e nutrientes depende de estruturas anatômicas, sendo o xilema o tecido responsável (WU et al., 2011; LUCAS et al., 2013). Além disso, ele é um dos principais componentes do sistema vascular relacionado ao vigor da planta (SANTAROSA et al., 2016) e, dessa forma, plantas menos vigorosas podem ser mais suscetíveis ao ataque de patógenos. Além disso, modificações no sistema vascular das folhas podem influenciar de forma significativa a fotossíntese, o crescimento e o desenvolvimento das plantas (FIGUEIREDO et al., 2013).

A condutância estomática é a característica fisiológica que mais contribuiu para a divergência dos genótipos nos dois tempos de avaliação. Ela está relacionada com a abertura dos estômatos, sendo proporcional ao número, ao tamanho e ao diâmetro de abertura dos estômatos, que são características que dependem de fatores genéticos e ambientais (GALON et al., 2013), podendo influenciar a entrada de patógenos e também ser alterada após a penetração (GUERRA et al., 2014; CASTRO et al., 2017; JIANG et al., 2016). Dessa forma, o diâmetro de vasos de xilema e a condutância estomática podem ser características importantes na divergência genética, a fim de selecionar genótipos resistentes à ferrugem e que tenham a capacidade de se reestabelecer após o estresse ocasionado pelo fungo *Hemileia vastatrix*.

A baixa contribuição das características espessura da epiderme adaxial e razão de carboxilação para a divergência dos genótipos, nas duas avaliações, sugere que essas características morfofisiológicas podem ser dispensáveis em futuros trabalhos, reduzindo gastos de mão de obra, custo e tempo (AZEVEDO et al., 2015).

De maneira geral, ao comparar os agrupamentos obtidos 1 DAI e 160 DAPI, constata-se que os genótipos de café respondem de forma diferente à inoculação com o fungo *Hemileia vastatrix*, ou seja, antes da inoculação, os genótipos foram agrupados de forma semelhante, tanto para as características fisiológicas como anatômicas. Porém, após a inoculação, os genótipos se agruparam de forma diferente entre características fisiológicas e anatômicas. Há evidências de que as plantas tendem a alterar sua fisiologia e metabolismo em resposta a estresses (BRUCE et al., 2007). Essas modificações podem ser genéticas, bioquímicas ou estruturais, fazendo com que respostas às tensões futuras sejam diferentes, conferindo às plantas capacidade de aclimação e benefícios adaptativos ao longo da vida ou para gerações futuras (CRISP et al., 2016).

5 CONCLUSÕES

As plantas de café analisadas se agruparam de forma diferente, tanto para características anatômicas quanto para fisiológicas, antes e após a inoculação, o que sugere diferentes adaptações dos genótipos estudados frente ao estresse causado pelo fungo *Hemileia vastatrix*.

As características que mais contribuíram para a divergência genética total dos genótipos de café analisados, antes e após a inoculação com o patógeno *Hemileia vastatrix*, foram diâmetro de vasos do xilema e condutância estomática.

As características que menos contribuíram, em ambos os tempos de avaliação, foram espessura da epiderme adaxial e razão de carboxilação.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. A. et al. Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. **Acta Physiol. Plant**, v.33, p. 1831-1839, 2011.
- ARAÚJO, A.G. et al. Host-pathogen interactions of *Musa* spp. and *Mycosphaerella musicola* with epidemiological variables and leaf anatomy within the pathosystem of Yellow Sigatoka disease. **Aust. J. Crop Sci**, v.8, p. 1200–1209, 2014.
- AZEVEDO, A.M. et al. P. Divergência genética e importância de caracteres em genótipos de batata-doce visando a produção de silagem. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 3, p. 479- 484, 2015.
- BARBIERI JÚNIOR, E. et al. Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tofton 85. **Ciência Rural**, v.42, p.2242-2245, 2012.
- BEDENDO, I. Ferrugens. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, p.479-484, 2011.
- BENITEZ, L. C. et al. Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.409-416, 2011.
- BERGER, S. et al. Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A.thaliana*. **J Exp Bot**, v.58, p.797–806, 2007.
- BERMÚDEZ-CARDONA, M.; WORDELL FILHO, J.M.; RODRIGUES, F.A. Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence in maize leaves infected with *Stenocarpella macrospora*. **Phytopathol**, v.105, p.26–34, 2015.
- BOTELHO, C. E. et al. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de café arábica em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 45, n. 12, p. 1404-1411, 2010.
- BRUCE, T.J.A. et al. Stressful memories of plants: evidence and possible mechanisms RID B-8523-2009. **Plant Sci**.v.173, p.603–608, 2007.
- CAPUCHO, A.S. et al. Inheritance of coffee leaf rust resistance in Timor Hybrid UFV 443-03. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p. 276-82, 2009.
- CARDOSO, D.A. et al. Seleção de progênies F4 oriundas do cruzamento Icatu e Catuai Amarelo com resistência à ferrugem. **Coffee Science**, v.11, n.4, p.555-566, 2016.
- CARVALHO, A. M. et al. Comportamento de cultivares de cafeeiro sob a incidência das doenças da ferrugem e cercosporiose em dois ambientes de cultivo. **Coffee Science**. Lavras, MG. v 12, n.1. p. 100-107, 2017.

CASTRO, G. L.S. et al. Anthracnose in açai palm leaves reduces leaf gas Exchange and chlorophyll a fluorescence. *Tropical Plant Pathology*, v.32, n.1, p.13-20, 2017.

CHATTOPADHYAY, S. et al. Association of leaf micro-morphological characters with powdery mildew resistance in field-grown mulberry (*Morus spp.*) germplasm. *AoB Plants*. v.2, p.1-11, 2011.

CHENG, Y. et al. Characterization of non-host resistance in broad bean to wheat stripe rust pathogen. *BMC Plant Biology* v.12, n.96, 2012.

CRISP, P.A. et al. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances*, v.2, n.2, 2016.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. 514p.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CUNHA, R.L. et al. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2. 2001, Vitória. **Resumos...** Vitória, ES: EMBRAPA Café, p.77-78, 2001.

DEBONA, D. et al. Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, v.104, p.34-39, 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. Consórcio brasileiro de pesquisas e desenvolvimento de café. **Catiguá MG1 e Catiguá MG2**: cultivares de café resistentes à ferrugem (S.1), (2004). Folder.

FIGUEIREDO, P.A.M. et al. Alterações morfoanatômicas foliares da cana-de-açúcar na fase de estabelecimento em condições de matocompetição. *Planta daninha*, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 777-784, 2013.

GALON, L. et al. Características fisiológicas de biótipos de *Conyza bonariensis* Resistentes ao glyphosate cultivados sob competição. *Planta daninha*, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 859-866, 2013.

GORTARI, F. et al. Plant-pathogen interactions: leaf physiology alterations in poplars infected with rust (*Melampsora medusae*). *Tree Physiology*, p.1-11, 2017.

GUEDES, J.M. et al. Genetic divergence among progenies resulting from the crossing of groups coffee timor Hybrid and Dilla & Alghe. *Journal of Agricultural Science and Technology*, v.3, p.865-872, 2013.

GUERRA, A.M.N.M. et al. Capacidade fotossintética de plantas de algodoeiro infectadas por ramulose e supridas com silício. *Bragantia*, v.73, p.50-64, 2014.

GUIMARÃES, P. T. G. et al. Cafeeiro. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG. p. 289-302, 1999.

HUSSAIN, Q. Peroxidase mediado descoloração e remediação de águas residuais contendo corantes industriais: uma revisão. **Rev Environ Sci Biotechnol**, v.9, p.117-140, 2010.

JIANG, Y. et al. Scaling of photosynthesis and constitutive and induced volatile emissions with severity of leaf infection by rust fungus (*Melampsora larici-populina*) in *Populus balsamifera* Var. *suaveolens*. **Tree Physiol**, v.38, p.856-872, 2016.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. 2a ed. New York: McGraw Hill, 1940. 523 p.,1940.

JYOSTHNA, M.K. et al. Morphological and biochemical characterization of *Phaeoisariopsis personata* resistant and susceptible cultivars of groundnut (*Arachis hypogaea*). **Plant Pathology Bulletin**, v.13, p. 243-250, 2004.

KÖPPEN, W. **Climatologia**: con un estudio de los climas de la tierra. Mexico: Fondo de Cultura Econômica, 478 p., 1948.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Edur, 198p., 1997.

LIMA, M.L.P.; LOPES, C.A.; CAFÉ FILHO, A.C. Padrão estomático de *Capsicum* ssp. resistentes e suscetíveis a *Oidiopsis haplophylli*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.25-29, 2010.

LOURENÇO, H.A.O. et al. Anatomia foliar de diferentes cultivares de soja e sua relação com incidência e severidade de doenças. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v.4, n.3, p.37-47, 2011.

LUCAS, W.J. et al. The plant vascular system: evolution, development and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, v.55, p.294-388, 2013.

MAHAJAN, M.; DHILLON, M.; BHARDWAJ, K. Investigation of different leaf characters on muskmelon cultivars possessing grades of resistance to downy mildew disease. **Int J Pharma Bio Sci.**, v.8, n.3, p. 1129-1140, 2017.

MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L. Divergência genética entre acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek e *M. aquifolium* Mart.) com base em caracteres morfológicos e fisiológicos. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v.12, n.3, p.243-249, 2010.

MEIRMANS, P.G. AMOVA-Based Clustering off Population Genetic Data. **J Hered.** v.103, n.5, p.744-750, 2012.

MONTEIRO, A.C.A. et al. Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. **Biochem Mol Analisa J Phytopathol**, v.164, p.1043-1053, 2016.

- PAIVA, J.G.A. et al. Verniz vitral incolor 500®: a mounting medium alternative and economically viable. **Acta Bot. Bras**, v.20, p. 257-264, 2006.
- PANDEY, P. et al. Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. **Front Plant Sci**, v.8, 2017.
- PATOLE, S.P. et al. Anatomical Basis of Resistance against Bacteria Blight of Cotton Caused by Xam Race No. 18, **Int. J. Pure App. Biosci.**v.5, n.5, p. 452-455, 2017.
- PETEK, M.R, SERA, T, FONSECA, I.C.D.B. Prediction of genetic additive values for development of a coffee cultivar with increased rust resistance. **Bragantia**, v. 67(1), p.133–140, 2008.
- REJEB, I., PASTOR, V., MAUCH-MANI, B. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. **Plants**, v.3, p. 458–475, 2014.
- SALUSTIANO, M. E. et al. Variabilidade em dez populações de *Hemileia vastatrix* em relação à germinação e ao comprimento do tubo germinativo em quatro temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, 2008.
- SAMIYARSIH, S., JUWARNO, J., MULJOWATI, J.S. Sweet potato anatomy of the structural resistance of leaves for fungal pathogen *Potatoes sphaceloma*. **Biosaintifika: Journal of Biology & Biologia Educação**, v.10, n.1, p. 131-137, 2018.
- SANTAROSA, E. et al. Alterações anatômicas do sistema vascular em porta-enxertos de videira. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v. 51, n. 4, p. 320-329, 2016.
- SARKAR, R.K, et al. A comparative performance of clustering procedures for mixture of qualitative and quantitative data—an application to black gram. **Plant genetic resources**, v. 9, n.4, p. 523-527, 2011.
- SETOTAW, T. A. et al. Coefficient of Parentage in *Coffea arabica* L. Cultivars Grown in Brazil. **Crop Sci.** v.53, p.1237–1247, 2013.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Lancaster, v. 67, p. 1051–1056, 1977.
- SILVA, A.R.A. et al. Troca gasosa em plantas de girassol submetidas a déficit hídrico em diferentes estágios de crescimento. **Rev Ciênc Agron**, v.44, p. 86–93, 2013.
- SILVA, J.M. et al. Divergência genética entre progênies de *Pinus caribaea* var. *caribaea* com base em caracteres quantitativos. **Pesq.flo.bras.**, v.32, n.69, p.69-77, 2012.
- SILVA, L. et al. Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.9, p.965-972, 2010.
- SILVA, M.D.C. et al. Resistência do cafeeiro às principais doenças: ferrugem da folha e doença do café. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.18, n. 1, p.119-147, 2006.

SILVA, R.A. et al. The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. **Euphytica**, v.214, n.153, p.1-16, 2018.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v. 41, n. 2, p. 237-245, 1981.

SOBREIRA, F.M.et al. Divergence among arabica coffee genotypes for sensory quality. **Australian J.Crop.Sci**, v.10, n.10, p.1442-1448, 2016.

SUSILO, A.W. et al. Herosis analysis of leaf stomatal characteristics on F1 population of cocoa (*Theobroma cacao* L.) related to vascular streak dieback resistance. **Coffee and Cocoa Research Journal**, v. 33, n.3, 2017.

TRIVEDI, R. Morpho-anatomical characterization of groundnut genotypes showing differential reaction to late leaf spot pathogen. **SAT e Journal**, v.12, 2014.

WU, H.et al. Three-dimensional distribution of vessels, passage cells and lateral roots along the root axis of winter wheat (*Triticum aestivum*). **Annals of Botany**, v.107, p.843-853, 2011.

XU, G. et al. Potential structural and biochemical mechanisms of compositae wild species resistance to *Alternaria tenuissima*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, p.491–497, 2011.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.41, p.1-8, 2016.

ARTIGO 3

Rede de correlações entre características morfofisiológicas e de crescimento de genótipos de cafeeiros inoculados com *Hemileia vastatrix*

*Mariana Thereza Rodrigues Viana

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme instrução do Manual de normalização da UFLA

*Doutora em Fitotecnia, Departamento de Fitotecnia, UFLA. E-mail: marianatriv@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se, com o estudo, construir redes de correlação ponderadas e identificar padrões de correlação fenotípica entre características morfofisiológicas e de crescimento de genótipos cafeeiros inoculados com *Hemileia vastatrix*. Os dados foram extraídos de um experimento em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas. Foram utilizados 10 genótipos de cafeeiro oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de Café do Estado de Minas Gerais, pertencente à Epamig. As mudas foram produzidas em viveiro e, após um mês de aclimação em casa de vegetação, foi realizada a inoculação artificial. As avaliações anatômicas e fisiológicas foram realizadas em dois tempos, 1 DAI (dia antes da inoculação) e 160 DAPI (dias após a inoculação). As avaliações de crescimento foram realizadas ao final do experimento, aos 160 DAPI. Foram avaliados 10 caracteres fisiológicos, 19 caracteres anatômicos e cinco caracteres de crescimento. Além disso, avaliou-se a severidade de doença a partir do aparecimento dos primeiros sintomas, por meio do cálculo da área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD). As matrizes de correlação foram obtidas e analisadas por meio de redes de correlação ponderadas. Foi feita uma rede de correlação para a avaliação 1 DAI e outra para a avaliação aos 160 DAPI, nas quais as conexões entre variáveis foram determinadas pela "matriz de adjacência" $A=h(R)$, com a seguinte função: $h_{(rij)} = 1/2 \{SNG(|rij| - \rho) + 1\}$, em que ρ é o parâmetro que determina o valor mínimo que uma correlação deve ter para ser representada na rede de correlações, sendo adotado ρ igual a 0 e o valor de corte igual a 0,5. As análises foram realizadas utilizando-se o aplicativo computacional Genes. Houve correlação fenotípica positiva e negativa entre a severidade de doença e as características morfofisiológicas, quando avaliadas as folhas 1 DAI e aos 160 DAPI. Conclui-se que a utilização de rede de correlações é uma técnica eficiente no estudo das correlações entre caracteres, podendo auxiliar na tomada de decisões em programas de melhoramento genético do cafeeiro.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Pré-seleção. Associação entre caracteres. Ferrugem do café.

1 INTRODUÇÃO

A principal doença do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Em regiões cafeeiras onde as condições climáticas são favoráveis à doença ocorrem perdas que vão de 30% a 50% da produção (ZAMBOLIM, 2016). Embora, nos últimos anos, tenham sido lançados vários genótipos de café considerados resistentes a essa doença, é necessário um trabalho contínuo dos melhoristas, visto que a durabilidade da resistência das cultivares é difícil de ser prevista, devido à quebra de resistência ocasionada pelo aparecimento de novas raças fisiológicas do fungo (VÁRZEA; MARQUES, 2005).

A resistência contra patógenos, principalmente os foliares, como é o caso da ferrugem do café, pode estar diretamente associada às características anatômicas das folhas (CHATTOPADHYAY et al., 2011). As propriedades da superfície da planta, incluindo a quantidade de cera e cutícula, a estrutura da parede das células epidérmicas, o tamanho, a localização e a forma dos estômatos, desempenham papel importante como barreiras físicas das plantas (DÍAZ; FERERES, 2007). Além disso, os estômatos participam de funções fisiológicas essenciais para as plantas, como a respiração, a transpiração e a fotossíntese, permitindo a entrada e a saída de gases e vapor d'água (ENNAJEH et al., 2010; ZENG; MELOTO; HE, 2010). Dessa forma, a associação entre a anatomia e a fisiologia vegetal e a fitopatologia é de fundamental importância para o melhor entendimento da patogênese e das reações apresentadas pelo hospedeiro, quando exposto à ação de patógenos, bem como para verificar diferenças estruturais pré e pós-formadas, capazes de conferir resistência à planta (JERBA et al., 2005; RESENDE et al., 2011).

A associação entre as características anatômicas e fisiológicas do cafeeiro tem se destacado como um importante instrumento para auxiliar na caracterização e na seleção de cultivares em programas de melhoramento genético (BATISTA et al., 2010). Dessa forma, há necessidade de estudos que verifiquem a possibilidade de utilizar essas características em conjunto com o melhoramento convencional, no intuito de oferecer, em um menor tempo, respostas às principais limitações enfrentadas pelos programas de melhoramento genético do cafeeiro (CASTANHEIRA et al., 2016).

O conhecimento das relações existentes entre caracteres, nas fases iniciais de um programa de melhoramento genético (SILVA et al., 2016), tais como estimadas pelas correlações, tem sido de grande importância, pois fornece informações úteis no processo de seleção (NOGUEIRA et al., 2012). Conhecer essas correlações se torna necessário para medir

o grau de associação entre variáveis e possibilitar avaliar o quanto a alteração em uma variável pode afetar as demais (SILVA et al., 2016). Se a seleção de uma variável é dificultada pela baixa herdabilidade ou por problemas de mensuração e identificação, esse tipo de conhecimento se torna importante nas diferentes etapas dos programas de melhoramento (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

Uma técnica que tem sido utilizada em muitas áreas para associar caracteres de forma simples e útil é a rede de correlação (DILEO et al., 2011; PEARCE et al., 2015; KUMAR; DEO, 2012; SABA et al., 2014), que já foi utilizada em trabalhos de melhoramento genético de pimenta (SILVA et al., 2016) e alho (SILVA; CECON; PUIATTI, 2015). Segundo Epskamp et al. (2012), uma análise de rede de correlação pode ajudar na identificação de padrões de correlação sugestivos em uma matriz de correlação que são difíceis de extrair quando os valores são apresentados numericamente. Na rede de correlação, as variáveis são representadas por nós, que estão conectados por linhas, sendo que a espessura da linha indica a força da correlação entre dois caracteres (SILVA et al., 2016).

Diante disso, objetivou-se construir redes de correlação ponderadas e identificar padrões nas correlações fenotípicas entre características morfofisiológicas e de crescimento de genótipos de cafeeiros inoculados com *Hemileia vastatrix*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das sementes para formação das mudas

O Banco Ativo de Germoplasma de Café do Estado de Minas Gerais pertence à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais e foi instalado, em 2004, na Fazenda Experimental de Patrocínio, na região do Alto Paranaíba, situada a 18°59'26" de latitude sul e 48°58'9,5" de longitude oeste, à altitude de, aproximadamente, 1.000 metros. O solo é do tipo Latossolo Vermelho Amarelo distrófico. O relevo da área é de topografia plana com ligeira inclinação e o clima é classificado como mesotérmico subtropical temperado, com chuvas de verão, inverno seco e verão quente (Wca), segundo Köppen (1948). O banco, atualmente, conta com, aproximadamente, 1.500 genótipos e apresenta grande variabilidade genética, constituída de fontes de resistência a pragas e doenças do cafeeiro.

No presente trabalho foram selecionados, do Banco de Germoplasma da Epamig, oito progênies de *Coffea arabica* do cruzamento entre Dilla & Alghe e Híbridos de Timor, do grupo dos genótipos resistentes à ferrugem. Além disso, foram utilizadas duas cultivares, sendo uma considerada resistente, Catiguá MG 3 (EPAMIG, 2004) e outra suscetível, Topázio MG 1190 (CARVALHO et al., 2017) (Tabela 1).

Tabela 1 - Genótipos selecionados do Banco de Germoplasma de Minas Gerais, em Patrocínio, MG.

Nº	Genótipo	Genealogia
1	MG 0579	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-01
2	MG 0580	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-03
3	MG 0581	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-06
4	MG 0582	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-07
5	MG 0583	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-09
6	MG 0587	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-25
7	MG 0588	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-30
8	MG 0591	<i>Dilla & Alghe</i> x H. Timor UFV 400-48
9	Catiguá MG3	Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 440-10
10	Topázio MG1190	Catuaí Amarelo x Mundo Novo

Fonte: Da autora (2018).

2.2 Produção de mudas, instalação do experimento e inoculação

As mudas foram produzidas em viveiro com 30% de sombreamento e irrigação controlada. A semeadura foi feita em sacos plásticos de polietileno, contendo substrato padrão (composto de 700 L de solo e 300 L de esterco de curral por metro cúbico de mistura, sendo adicionados 5 kg de superfosfato simples e 0,5 kg de cloreto de potássio), de acordo com Guimarães et al. (1999). Cada saco plástico recebeu três sementes. Quando as mudas apresentavam-se no estágio de folhas cotiledonares, foi realizado um desbaste, deixando-se apenas uma muda por saquinho.

Foram selecionadas as mudas mais vigorosas e uniformes, com três pares de folhas verdadeiras, e, então, levadas para casa de vegetação, onde ocorreu a aclimação. Durante todo o período experimental, as mudas foram irrigadas periodicamente, com a utilização de um sistema de irrigação com nebulizador de baixa vazão, e controle de temperatura (23 °C) e da umidade relativa do ar (70%). As mudas receberam adubações complementares de acordo com recomendação técnica para a cultura (GUIMARÃES et al., 1999).

Após um mês de aclimação, as plantas (com aproximadamente quatro pares de folhas verdadeiras) foram inoculadas artificialmente. Os esporos de *Hemileia vastatrix* foram obtidos a partir de folhas naturalmente infectadas de plantas de cafeeiro no campo, os quais foram coletados por meio de raspagem das pústulas e acondicionados em microtubos, protegidos da luz. Para a inoculação artificial das plantas foi preparada uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^5 urediniosporos mL^{-1} ágar-água (0,2% p/v), contendo Tween 20 (0,05% v/v) (SALUSTIANO et al., 2008). Posteriormente, a solução foi pulverizada em toda a planta, na parte abaxial das folhas, com o auxílio de um pulverizador manual. As mudas foram submetidas a uma câmara úmida na própria casa de vegetação, no escuro, pelo período de 72 horas (MONTEIRO et al., 2016). O delineamento adotado foi em blocos casualizados, com três repetições, tendo cada parcela sido constituída de três plantas.

2.3 Análise de severidade da ferrugem

Em cada muda foram realizadas cinco avaliações, com intervalos de sete dias, após o aparecimento dos primeiros sintomas (45 dias após a inoculação), a fim de avaliar a severidade de doença. Utilizou-se a escala diagramática proposta por Cunha et al. (2001). Em seguida, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), conforme Shaner e Finney (1977).

$$AACPSD = \sum_i^{n-1} \left[\frac{(x_i + x_{i+1})}{2} \right] * t$$

Em que n é o número de avaliações, x é a severidade da doença, i é o número de avaliações e t é o intervalo de tempo entre duas avaliações consecutivas.

2.4 Avaliações fisiológicas

As análises fisiológicas foram realizadas em dois tempos de avaliação, sendo eles 1 DAI (dia antes da inoculação), em folhas do terceiro par completamente expandidas antes da inoculação do patógeno e aos 160 DAPI (dias após a inoculação) na primeira folha completamente expandida após o estresse da inoculação, em uma muda por parcela.

2.4.1 Trocas gasosas

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas no período da manhã, entre 9 e 11 horas, com o auxílio de um analisador de gás por infravermelho (IRGA; Li-Cor Li-6400XT). Sua câmara de LED foi programada para uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram determinados os valores de fotossíntese líquida (A- $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração foliar (E- $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática ($\text{gs-mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), carbono interno (Ci - $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$), razão de carboxilação (relação Ci/Ca), eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci) (SILVA et al., 2010) e eficiência intrínseca de uso da água (EiUA) (A/gS) (SILVA et al., 2013).

2.4.2 Índice de clorofila

A determinação indireta dos teores relativos das clorofilas a, b e total foi obtida por meio do medidor portátil de clorofila ClorofiLOG (Falker Automação Agrícola, Brasil) que fornece valores denominados índices de clorofila Falker (ICF) proporcionais à absorvância das clorofilas. O ClorofiLOG constitui um equipamento eficaz na determinação indireta dos teores relativos das clorofilas a, b e total (BARBIERI JÚNIOR et al., 2012).

2.5 Avaliações anatômicas

Foram realizadas coletas de folhas em duas épocas, sendo elas 1 DAI, folhas do terceiro par completamente expandidas antes da inoculação do patógeno e 160 DAPI na primeira folha completamente expandida após o estresse da inoculação, após a última avaliação da severidade da doença. Em cada época foi coletada uma folha de uma planta por parcela, sendo as duas coletas realizadas na mesma planta. As folhas coletadas foram fixadas em álcool 70% ($v v^{-1}$) (JOHANSEN, 1940) e, após 72 horas, colocadas em nova solução de álcool 70% ($v v^{-1}$), visando à conservação do material, em temperatura ambiente até a data das análises.

As secções paradérmicas foram obtidas à mão livre com uso de lâmina de aço e, posteriormente, foram submetidas à clarificação com hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo), tríplice lavagem em água destilada e coloração com solução de safranina 1%, sendo, posteriormente, montadas em lâminas semipermanentes com glicerol 50% ($v v^{-1}$) (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Para as secções transversais o material vegetal foi submetido a concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) em intervalos de duas horas. As amostras foram incorporadas em historesina de acordo com as instruções do fabricante (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), obtendo-se secções (8 μm de espessura) com o auxílio de um micrótomo rotativo semiautomatizado modelo MRP 2015 da marca Lupetec Tecnologia Aplicada (Lupe Indústria Tecnológica de Equipamentos para Laboratório, Brasil). As secções foram coradas com azul de toluidina a 1% ($m v^{-1}$) e montadas com verniz vitral (PAIVA et al., 2006).

Foram preparadas três lâminas por folha e avaliados três campos por lâmina. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico, modelo Red 200, marca Kasvi/Motic, acoplado à câmera digital modelo D-Moticam 5MP marca Motic. Posteriormente, as imagens foram analisadas em software para análise de imagens UTHSCSA-Imagetool.

Nas secções paradérmicas foram avaliados o número de estômatos (ne), o número de células epidérmicas (ncl), o diâmetro polar dos estômatos (dp - μm), o diâmetro equatorial dos estômatos (de - μm), a frequência estomática ($frq = ne/ncl$) * 100), a densidade estomática ($den = nes/mm^2$), o índice estomático ($ind = (ne/(ncl+ne))$) * 100), a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial (dp/de).

As características avaliadas nas secções transversais foram espessura da cutícula da face abaxial (eca - μm), espessura da epiderme da face abaxial (eab - μm), espessura da epiderme da face adaxial (ead - μm), espessura do parênquima paliçádico (epp - μm), espessura do parênquima esponjoso (epe - μm), espessura do mesofilo (mes - μm), espessura do limbo foliar

(lim- μm), razão entre a espessura do parênquima paliçádico e do parênquima esponjoso (epp/epe), número de vasos de xilema (nvx), diâmetro de vasos do xilema (dvx- μm) e espessura do floema (efl- μm).

2.5 Avaliações de crescimento

Para avaliar o crescimento das plantas ao final do experimento, aos 160 DAPI, as variáveis adotadas foram altura das plantas (alt - cm), medida do colo das plantas até a gema apical; área foliar (aft - cm^2), estipulada pela fórmula $AF = \{[(\text{comprimento} \times \text{largura}) \times 0,667] \times 2\}$, proposta por Barros et al. (1973); peso seco das folhas (psf - g), caule (psc - g) e raiz (psr - g). Após a lavagem, com cuidado, das raízes e da parte aérea, retirou-se toda a terra, seccionou-se o caule na altura do colo, separando-se caule, folhas e raiz, os quais foram acondicionados em sacos de papel. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa de ar circulado, a 60°C , até peso constante. Pesou-se o material em balança de precisão, com medida dada em gramas.

2.6 Análise estatística

As matrizes de correlação foram obtidas e analisadas por meio das redes de correlação ponderadas. Foi feita uma rede de correlação para a avaliação 1 DAI e outra para a avaliação aos 160 DAPI, nas quais as conexões entre variáveis foram determinadas pela "matriz de adjacência" $A=h(R)$, com a seguinte função: $h_{(rij)} = 1/2 \{SNG(|rij| - \rho) + 1\}$, em que ρ é o parâmetro que determina o valor mínimo que uma correlação deve ser representada na rede de correlações. Neste trabalho, assim como no estudo de Silva et al. (2016), seu valor foi definido como zero, para que todas as conexões entre as variáveis pudessem ser traçadas. As características de severidade de doença e crescimento foram utilizadas na constituição das redes de correlação nos dois tempos de avaliação aos 1 DAI e 160 DAPI, visto que as plantas avaliadas foram as mesmas.

A espessura e a intensidade da cor das bordas foram controladas por aplicação de um valor de corte igual a 0,5 (SILVA; CECOM; PUIATTI, 2015), o que significa que apenas $|rij| \geq 0,5$ têm as suas linhas destacadas pela espessura. As correlações fenotípicas positivas foram coloridas em verde-escuro; já as correlações fenotípicas negativas foram coloridas em vermelho. Correlações positivas indicam a tendência de uma variável aumentar quando a outra aumenta; correlações negativas indicam a tendência de uma variável aumentar enquanto a outra diminui.

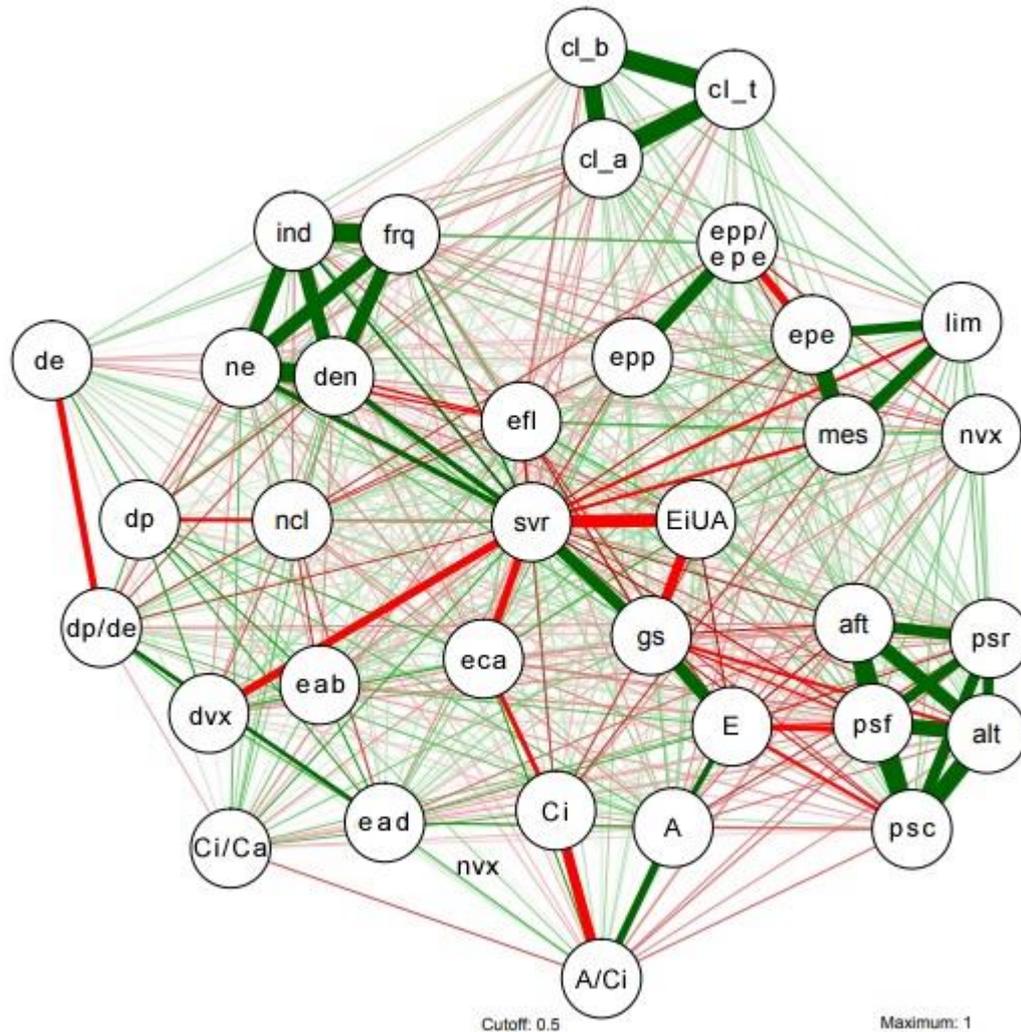
As análises foram realizadas utilizando-se o aplicativo computacional Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS

3.1 Redes de correlação

A severidade de doença apresentou correlação fenotípica positiva com as características anatômicas das folhas número de estômatos (ne) e densidade estomática (den), e com a característica fisiológica condutância estomática (gs). Houve correlação fenotípica negativa entre a severidade de doença e as características anatômicas espessura da cutícula abaxial (eca) e diâmetro de vasos do xilema (dvx), e a característica fisiológica eficiência intrínseca de uso da água ($EiUA$). Houve correlação fenotípica positiva entre a taxa fotossintética líquida (A) e a condutância estomática (gs) e entre a transpiração foliar (E) e a condutância estomática (gs) (Figura 1).

Figura 1 - Rede de correlações fenotípicas entre características morfofisiológicas e de crescimento de mudas de café inoculadas com *Hemileia vastatrix* - 1 DAI (dia antes da inoculação).



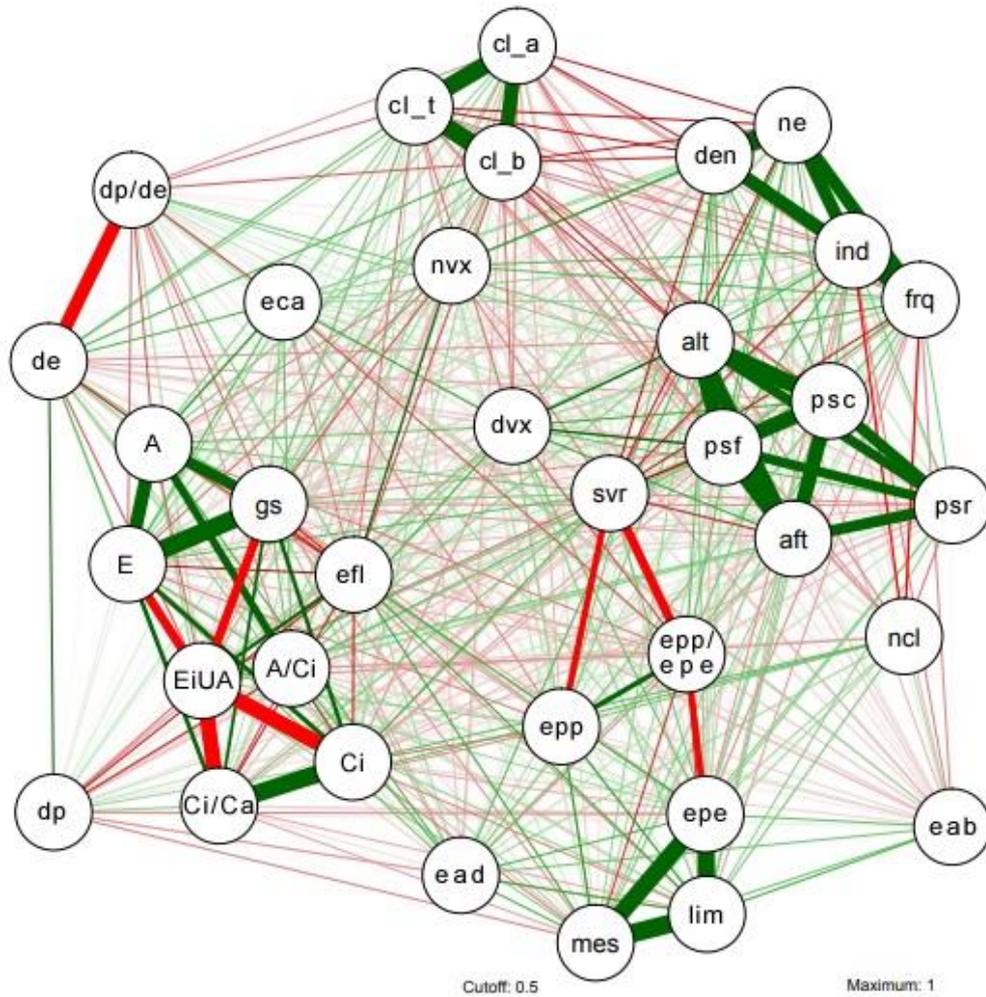
Legenda: a espessura da linha é proporcional à magnitude da correlação. As linhas em destaque apresentam correlação em módulo maior que 0,5 (Cutoff). As linhas vermelhas representam correlação fenotípica negativa e as linhas verdes representam correlações fenotípicas positivas. Variáveis de crescimento: alt (altura da planta), aft (área foliar total), psf (peso seco das folhas), psr (peso seco das raízes), psc (peso seco do caule). Variáveis fisiológicas: A (taxa fotossintética líquida), E (transpiração foliar), gs (condutância estomática), Ci (concentração de carbono interno), A/Ci (eficiência instantânea de carboxilação), Ci/Ca (razão de carboxilação), EiUa (eficiência intrínseca de uso da água), cl_a (índice de clorofila a), cl_b (índice de clorofila b), cl_t (índice de clorofila total), ind (índice estomático), frq (frequência estomática), ne (número de estômatos), den (densidade estomática), ncl (número de células epidérmicas), dp (diâmetro polar dos estômatos), de (diâmetro equatorial dos estômatos), dp/de (razão diâmetro polar e diâmetro equatorial), eca (espessura da cutícula abaxial), eab (espessura da epiderme da face abaxial), ead (espessura da epiderme da face adaxial), epp (espessura do parênquima paliçádico), epe (espessura do parênquima esponjoso), epp/epe (razão da espessura do parênquima paliçádico e esponjoso), lim (espessura do limbo foliar), mes (espessura do mesofilo), nvx (número de vasos do xilema), dvx (diâmetro de vasos do xilema), efl (espessura do floema). Variável de doença: svr (severidade de ferrugem).

Fonte: Da autora (2018).

Houve correlação fenotípica negativa entre a severidade de doença e as características espessura do parênquima paliçádico (epp) e razão espessura do parênquima paliçádico e parênquima esponjoso (epp/epe). Características de crescimento, índices de clorofila, características estomáticas e do limbo (mes, epe e lim) e de trocas gasosas (A, gs e E) se correlacionaram positivamente entre si (Figura 2).

É possível observar que tanto na rede de correlações referente a 1 DAI (Figura 1) como aos 160 DAPI (Figura 2) as características de crescimento, características anatômicas do limbo foliar e características estomáticas e fisiológicas (trocas gasosas e índice de clorofilas) formaram grupos separados fortemente correlacionados entre si, sendo que entre os diferentes grupos formados não houve correlação.

Figura 2 - Rede de correlações fenotípicas entre características morfofisiológicas e de crescimento de mudas de café inoculadas com *Hemileia vastatrix* - 160 DAPI (dias após a inoculação).



Legenda: a espessura da linha é proporcional à magnitude da correlação. As linhas em destaque apresentam correlação em módulo maior que 0,5 (Cutoff). As linhas vermelhas representam correlação fenotípica negativa e as linhas verdes representam correlações fenotípicas positivas. Variáveis de crescimento: alt (altura da planta), aft (área foliar total), psf (peso seco das folhas), psr (peso seco das raízes), psc (peso seco do caule). Variáveis fisiológicas: A (taxa fotossintética líquida), E (transpiração foliar), gs (condutância estomática), Ci (concentração de carbono interno), A/Ci (eficiência instantânea de carboxilação), Ci/Ca (razão de carboxilação), EiUa (eficiência intrínseca de uso da água), cl_a (índice de clorofila a), cl_b (índice de clorofila b), cl_t (índice de clorofila total), ind (índice estomático), frq (frequência estomática), ne (número de estômatos), den (densidade estomática), ncl (número de células epidérmicas), dp (diâmetro polar dos estômatos), de (diâmetro equatorial dos estômatos), dp/de (razão diâmetro polar e diâmetro equatorial), eca (espessura da cutícula abaxial), eab (espessura da epiderme da face abaxial), ead (espessura da epiderme da face adaxial), epp (espessura do parênquima paliçádico), epe (espessura do parênquima esponjoso), epp/epe (razão da espessura do parênquima paliçádico e esponjoso), lim (espessura do limbo foliar), mes (espessura do mesofilo), nvx (número de vasos do xilema), dvx (diâmetro de vasos do xilema), efl (espessura do floema). Variável de doença: svr (severidade de ferrugem).

Fonte: Da autora (2018).

4 DISCUSSÃO

As primeiras barreiras que os microrganismos encontram para estabelecer a infecção foram a cutícula e a parede celular (MUSSURY et al., 2012). Embora o patógeno *Hemileia vastatrix* penetre na planta por meio dos estômatos (BEDENDO et al., 2011), a cutícula pode exercer papel fundamental na resistência, sendo que cutículas mais espessas ou mais densas podem tornar a planta mais resistente. Além disso, os compostos presentes na cutícula é que são responsáveis pela sinalização capaz de ativar outros mecanismos de defesa das plantas, como, por exemplo, as proteínas relacionadas à patogenicidade, conhecidas como proteínas – RP (REINA-PINTO; YEPHREMOV, 2009). Neste trabalho a correlação negativa encontrada entre a severidade de ferrugem e a espessura da cutícula abaxial em folhas avaliadas antes da inoculação (1 DAI) pode ser um dos mecanismos de defesa estrutural pré-formado da planta de café.

A severidade de doença correlacionou-se positivamente com características dos estômatos das folhas antes da inoculação (1 DAI) e, dessa forma, a quantidade, a densidade e a condutância estomática podem estar associadas à resistência à doença nos genótipos avaliados, visto que o fungo penetra por meio dos estômatos (BEDENDO et al., 2011). O maior número de estômatos em genótipos de pimentão foi correlacionado com a maior incidência de oídio (LIMA; LOPES; CAFÉ-FILHO, 2010). O número de estômatos por unidade de área da superfície da folha, que corresponde à densidade estomática, foi positivamente correlacionada com a incidência de oídio em amoreira cultivada em campo (CHATTOPADYWHAY et al., 2011), sendo que, assim como a ferrugem do café, esses fungos têm penetração pelos estômatos.

Plantas com maior eficiência do uso da água são mais eficientes em manter a assimilação de carbono, controlando a transpiração, sem prejudicar a taxa fotossintética (FERREIRA; GONÇALVES; FERRAZ, 2012). A maior eficiência do uso da água nas plantas pode estar associada a uma menor condutância estomática, já que ela está diretamente relacionada ao tempo de abertura estomática (CONCENÇO et al., 2007). Neste trabalho, a severidade de doença foi correlacionada positivamente com a condutância estomática e negativamente com a eficiência de uso da água, portanto, quanto maior a condutância estomática menor é a eficiência de uso da água da planta e maior a severidade de doença. Além disso, plantas que apresentam maior eficiência de uso da água conseguem fixar mais CO₂ com a abertura dos estômatos em um curto espaço de tempo, tendo maiores condições de sobreviver e reproduzir em ambientes com estresse (BATISTA et al., 2010).

Plantas que apresentam maior número e diâmetro de vasos de xilema podem ser mais vigorosas, já que estas características dos vasos estão relacionadas ao potencial de condutividade hidráulica e fluxo de seiva (COHEN et al., 2007; BRODERSEN et al., 2010). Assim, o maior diâmetro de vasos de xilema pode otimizar a fotossíntese e, conseqüentemente, promover maior crescimento e desenvolvimento da planta (RIBEIRO et al., 2012). Houve correlação fenotípica negativa entre a severidade de doença e o diâmetro de vasos do xilema, ou seja, plantas de café que apresentam menor vigor são mais suscetíveis ao ataque da ferrugem.

Aos 160 DAPI, a severidade de ferrugem apresentou correlação fenotípica negativa com as características espessura do parênquima paliçádico e razão entre espessura do parênquima paliçádico e parênquima esponjoso. Em um estudo realizado com a espécie *Zoysia japonica*, conhecida como grama-esmeralda, encontrou-se correlação negativa entre a ferrugem (*Puccinia zoysiae*) e a espessura do parênquima esponjoso e paliçádico (MANLI et al., 2018). Esses tecidos mais espessos podem retardar ou impedir o desenvolvimento de hifas devido à incapacidade de o agente patogênico penetrar e colonizar as células dos tecidos parenquimáticos (TRIVEDI et al., 2014). De acordo com Araujo et al. (2014), que estudaram os mecanismos de resistência estrutural em folhas de bananeiras, o aumento da espessura desses tecidos parece ser uma estratégia desenvolvida pelas plantas para evitar a inoculação e o desenvolvimento de fungos como a *Mycosphaerella musicola*, agente causal da sigatoka amarela

As características anatômicas, principalmente estomáticas e do limbo foliar, e as características fisiológicas formaram grupos distintos e correlacionaram entre si. Em um trabalho realizado com 24 genótipos de arroz, estudando características estruturais e fisiológicas, foram observados dois grupos diferentes, cujas características correlacionaram-se entre si, sendo o grupo das características estruturais, como espessura do limbo e mesófilo, e o das características fisiológicas, como condutância estomática e transpiração (GIULIANI et al., 2013). Dessa forma, investigar as relações existentes entre anatomia foliar e características fotossintéticas poderia levar à identificação de características estruturais e fisiológicas que afetem positivamente a produtividade das culturas, além de melhorar nossa compreensão da evolução e adaptação das plantas (EVANS et al., 2009).

Houve correlação fenotípica positiva entre as características de crescimento (área foliar, altura da planta, peso seco da raiz, caule e folha), indicando que a área foliar e a altura da planta apresentam comportamento diretamente proporcional ao acúmulo de matéria seca de mudas de café. Resultados semelhantes foram encontrados em mudas de goiabeira (FRANCO et al., 2007), mudas de maracujazeiro (SILVA; PEIXOTO; JUNQUEIRA, 2001) e mudas de umbuzeiro (MELO et al., 2005).

As plantas estão expostas diariamente às pressões do meio em que estão inseridas e, para superar e/ou sobreviver às diversas situações, fazem uso de mecanismos morfológicos, fisiológicos e de produção de substâncias de maneira conjunta ou isoladamente, que variam de acordo com a espécie, o estágio fenológico da planta e o tipo e o grau de severidade do estresse. Os caminhos para adaptações em plantas são variados e os danos causados por organismos vivos também contribuem para alterações no metabolismo (ALVES et al. 2011; GALON et al., 2013; GUO et al., 2005, TIWARI et al., 2012).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que existe uma possível resistência estrutural e fisiológica dos genótipos de café avaliados ao patógeno *Hemileia vastatrix*, além de um mecanismo de adaptação das plantas para combater o patógeno após o estresse ocasionado pela doença. De maneira geral, foram observados padrões de correlação entre as características avaliadas e a severidade de ferrugem, tanto antes como após o estresse biótico. A situação de estresse pode afetar tanto a estrutura anatômica quanto as funções fisiológicas das plantas e, dessa forma, a utilização dessas características tem se tornado uma ferramenta para a seleção de genótipos tolerantes às condições adversas de cultivo (BAKER; ROSENQVIST, 2004).

O uso de redes de correlação é viável para elevar a eficácia da seleção no melhoramento do cafeeiro, uma vez que permite, com rapidez, identificar os pares de características que apresentam correlações de maior magnitude (SILVA et al., 2016), além de determinar os grupos de variáveis que influenciam de maneira mais expressiva as características mais importantes para o programa de melhoramento. Também foram observadas potencialidades do uso das redes de correlação em programas de melhoramento genético da pimenta e do alho (SILVA et al., 2016; SILVA; CECOM; PUIATTI, 2015). De modo geral, as relações observadas nas redes de correlação podem servir como diretrizes gerais para melhoristas (SILVA; CECOM; PUIATTI, 2015), principalmente no início dos programas de melhoramento de café visando resistência à ferrugem quando a seleção poderia ser realizada com o objetivo de aumentar a porcentagem de genótipos mais bem preparados, anatomicamente e fisiologicamente, para o ataque do fungo.

5 CONCLUSÃO

Foram identificados grupos de características correlacionadas envolvendo características morfofisiológicas e de crescimento de genótipos de cafeeiros inoculados com *Hemileia vastatrix*. Menor espessura da cutícula abaxial, menor diâmetro de vasos do xilema, menor eficiência instantânea do uso da água e maior número e densidade de estômatos, bem como maior condutância estomática, proporcionaram maior severidade da doença. Menor espessura do parênquima paliçádico e menor razão entre espessura do parênquima paliçádico e parênquima esponjoso podem ter sido ocasionadas em cafeeiros que apresentaram maior severidade da doença em função da inoculação do patógeno.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. A. et al. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 1831-1839, 2011.
- ARAÚJO, A.G. et al. Host-pathogen interactions of *Musa* spp. and *Mycosphaerella musicola* with epidemiological variables and leaf anatomy within the pathosystem of Yellow Sigatoka disease. **Australian Journal of Crop Science**, v.8, n.8, p.1200-1209, 2014.
- BAKER N.R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607-21, 2004.
- BARBIERI JÚNIOR, E. et al. Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tofton 85. **Ciência Rural**, v.42, p.2242-2245, 2012.
- BARROS, R.S.et al. Determinação de área de folhas do café (*Coffea arabica* L. cv. 'Bourbon Amarelo'). **Revista Ceres**, Viçosa, v.20, n.107, p.44-52, 1973.
- BATISTA, L.A.et al. Anatomia foliar e potencial hídrico na tolerância de cultivares de café ao estresse hídrico. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.41, n.3, p.475-481, 2010.
- BEDENDO, I. Ferrugens. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, p.479-484, 2011.
- BRODERSEN, C.R.et al. The dynamics of embolism repair in xylem: in vivo visualizations using high-resolution computed tomography. **Plant Physiology**, v.154, p.1088-1095, 2010.
- CARVALHO, A. M. et al. Comportamento de cultivares de cafeeiro sob a incidência das doenças da ferrugem e cercosporiose em dois ambientes de cultivo. **Coffee Science**. Lavras, MG. v.12, n.1. p. 100-107, 2017.
- CASTANHEIRA, D.T.et al. Potencial de utilização de características anatômicas e fisiológicas na seleção de progênies de cafeeiros. **Coffee Science**, v.11, n.3, p.374-385, 2016.
- CHATTOPADHYAY, S. et al. Association of leaf micro-morphological characters with powdery mildew resistance in field-grown mulberry (*Morus spp.*) germplasm. **AoB Plants**. v.2, p.1-11, 2011.
- COHEN, S. et al. Hydraulic resistance components of mature apple trees on rootstocks of different vigours. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.4213-4224, 2007.
- CONCENÇO, G. et al. Uso da água em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) em condição de competição. **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p. 449-455, 2007.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI A. J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG: UFV, v. 1. 512p., 2012.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CUNHA, R.L. et al. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2. 2001, Vitória. **Resumos...** Vitória, ES: EMBRAPA Café, p.77-78, 2001.

DÍAZ, B.M, FERERES, A. Ultraviolet-blocking materials as a physical barrier to control insect pests and plant pathogens in protected crops. **Pest Technol**. v. 1, n.2.p.85–95, 2007.

DILEO, M.V. et al. Weighted correlation network analysis (WGCNA) applied to the tomato fruit metabolome. **PLoS ONE**, v.6, n.10, p. 26683 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. Consórcio brasileiro de pesquisas e desenvolvimento de café. **Catiguá MG1 e Catiguá MG2**: cultivares de café resistentes à ferrugem (S.1), (2004). Folder.

ENNAJEH, M. et al. Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar. **J Hortic Sci Biotechnol**. v.85, n.4.p.289, 2010.

EPSKAMP, A. et al. Qgraph: Network Visualizations of Relationships in Psychometric Data. **Journal of Statistical Software**, v.48, n.4, p. 1-18, 2012.

EVANS, J.R. et al. 2009. Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. **J Exp Bot**, v.60, p. 2235–2248, 2009.

FERREIRA, M. J., GONÇALVES, J. F. de C., FERRAZ, J. B. S. Crescimento e eficiência do uso da água de plantas jovens de castanheira da Amazônia em área degradada e submetidas à adubação. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 2, p. 393-401, 2012.

FRANCO, C.F. et al. Growth and macronutrient uptake curves in guava seedling. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.6, p. 1429-1437, 2007.

GALON, L. et al. Influence of biotic and abiotic stress factors on physiological traits of sugarcane varieties. In: DUBINSKY, Z. (Ed.). **Photosynthesis**. Rijeka: In Tech, cap. 7, p. 185-208, 2013.

GIULIANI, R. et al. Coordination of leaf photosynthesis, transpiration, and structural traits in rice and wild relatives (genus *oryza*). **Plant Physiol**, v.162, n.3, p. 1632–51, 2013.

GUIMARÃES, P. T. G. et al. Cafeeiro. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG. p. 289-302, 1999.

GUO, D. P. et al. Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. **Plant Science**, v. 168, p. 57-63, 2005.

- JERBA, V.F.; RODELLA, R.A.; FURTADO, E.L. Relationship between bean leaf structure and the *Glomerella ingulata* f.sp. phaseoli preinfection. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.3, p.217-223, 2005.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. 2a ed. New York: McGraw Hill, 1940. 523 p.,1940.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**: con un estudio de los climas de la tierra. Mexico: Fondo de Cultura Econômica, 478 p., 1948.
- KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Edur, 198p., 1997.
- KUMAR, S.; DEO, N. Correlation and network analysis of global financial indices. **Physical Review E**, v.86, p.026101, 2012.
- LIMA, M.L.P.; LOPES, C.A.; CAFÉ FILHO, A.C. Padrão estomático de *Capsicum* ssp. resistentes e suscetíveis a *Oidiopsis haplophylli*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.25-29, 2010.
- MANLI, L. et al. Analysis of leaf tissue structures between rust-resistant and rust-susceptible *Zoysia* grass (*Zoysia japonica*). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.40, p.74-83, 2018.
- MELO, A.S. et al. Desenvolvimento de porta-enxertos de umbuzeiro em resposta à adubação com nitrogênio e fósforo. **Ciência Rural**, v.35, p.324-331, 2005.
- MONTEIRO, A.C.A. et al. Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. **Biochem Mol Analisa J Phytopathol**, v.164, p.1043-1053, 2016.
- MUSSURY, R.M. et al. Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.1, p.18-25, 2012.
- NOGUEIRA, A. P. O. et al. Path analysis and correlations among traits in soybean grown in two dates sowing. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, 2012.
- PAIVA, J.G.A. et al. Verniz vitral incolor 500®: a mounting medium alternative and economically viable. **Acta Bot. Bras**, v.20, p. 257-264, 2006.
- PEARCE, S. et al. FlowerNet: a gene expression correlation network for anther and pollen development. **Plant Physiology**, v.167, p.1717-1730, 2015.
- REINA-PINTO, J. J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, p.540–549, 2009.
- RESENDE, R. S. et al. Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected with *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, v.102, p.892-898, 2011.

- RIBEIRO, M.N.O et al. Anatomia foliar de mandioca em função do potencial para tolerância às diferentes condições ambientais. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.2, p.354-361, 2012.
- SABA, H. et al. Spatio-temporal correlation networks of dengue in the state of Bahia. **BMC Public Health**, v.14, p.1085, 2014.
- SALUSTIANO, M. E. et al. Variabilidade em dez populações de *Hemileia vastatrix* em relação à germinação e ao comprimento do tubo germinativo em quatro temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, 2008.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Lancaster, v. 67, p. 1051–1056, 1977.
- SILVA, A. R. D.et al. Correlation network analysis between phenotypic and genotypic traits of chilli pepper. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 4, p. 372-377, 2016.
- SILVA, A. R., CECON, P. R., PUIATTI, M. Phenotypic correlation network analysis of garlic variables. **Multi-Science Journal**, v.3, n.6, p. 9–12, 2015.
- SILVA, A.R.A. et al. Troca gasosa em plantas de girassol submetidas a déficit hídrico em diferentes estágios de crescimento. **Rev Ciênc Agron**, v.44, p. 86–93, 2013.
- SILVA, L. et al. Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.9, p.965-972, 2010.
- SILVA, R.P.; PEIXOTO, J.R. & JUNQUEIRA, N.T.V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* sims f. flavicarpa deg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p. 377-381, 2001.
- TIWARI, A. K. et al. Ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli*) of sugarcane. **Plant Knowledge Journal**, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2012.
- TRIVEDI, R. Morpho-anatomical characterization of groundnut genotypes showing differential reaction to late leaf spot pathogen. **SAT e Journal**, v.12, 2014.
- URSEM, R. et al. Correlation network approach to metabolic data analysis for tomato fruits. **Euphytica**, v.161, p.181-193, 2008.
- VARZEA, V.M.P, MARQUES, D.V. **Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance**. In: ZAMBOLIM, L; MACIEL- ZAMBOLIM, E; VÁRZEA, V.M.P (ed) Durable resistance to coffee leaf rust. UFV, Viçosa, p. 53–74, 2005.
- ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.41, p.1-8, 2016.
- ZENG W.Q, MELOTTO M, HE S.Y. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. **Curr Opin Biotechnol**. v.21, n.5.p.599–603, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cada vez mais, têm-se realizado estudos no intuito de reduzir número de aplicações e quantidade de fungicidas nas lavouras, além de diminuir as perdas na produção, visando obter um produto final de forma mais sustentável. Assim, torna-se necessário o uso de diferentes técnicas que auxiliem no pré-melhoramento genético, colaborando para o lançamento de novas cultivares do programa de melhoramento genético do cafeeiro, em um menor intervalo de tempo.

Embora já se tenha conhecimento acerca do manejo da ferrugem, materiais resistentes e da quebra de resistência em alguns materiais, pouco se sabe sobre as respostas anatômicas e fisiológicas que estão envolvidas na resistência do cafeeiro ao fungo *Hemileia vastatrix*. Dessa forma, o trabalho realizado de maneira multidisciplinar proporcionou o conhecimento integrado de características morfofisiológicas de genótipos de cafeeiros submetidos a este patógeno, além do conhecimento sobre os mecanismos de resistência utilizados por cada genótipo, bem como a identificação de indicadores de resistência à ferrugem promissores para uso em seleção assistida em programa de melhoramento genético, convencional e biotecnológico, do cafeeiro.

O trabalho em questão foi realizado com mudas em ambiente controlado e, dessa forma, é de grande interesse estabelecer, em avaliações futuras, o comportamento anatômico e fisiológico das plantas no campo em resposta à doença, visto que, no campo, as plantas estão submetidas a diferentes estresses bióticos e abióticos.