

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

ANGÉLICA TOMAZELI DA SILVA

**INTENSIDADE DA COLORAÇÃO VERDE FOLIAR EM GENÓTIPOS
DE *Coffea canephora*: DIVERGÊNCIA GENÉTICA E RELAÇÃO
COM O DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO**

Vitória, ES

2020

ANGÉLICA TOMAZELI DA SILVA

**INTENSIDADE DA COLORAÇÃO VERDE FOLIAR EM GENÓTIPOS
DE *Coffea canephora*: DIVERGÊNCIA GENÉTICA E RELAÇÃO
COM O DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Cavatte

Coorientador: Prof. Dr. José Francisco Teixeira do Amaral

Vitória, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

da Silva, Angélica Tomazeli, 1992-

D111i Intensidade da coloração verde foliar em genótipos de *Coffea canephora*: divergência genética e relação com o desempenho fotossintético / Angélica Tomazeli da Silva. - 2020. 76 f. : il.

Orientador: Paulo Cezar Cavatte. Coorientador: José Francisco Teixeira do Amaral. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1 . Café. 2. Fotossíntese. 3. Fisiologia vegetal. 4. Fluorescência. I. Cavatte, Paulo Cezar. II. do Amaral, José Francisco Teixeira. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

**INTENSIDADE DA COLORAÇÃO VERDE FOLIAR EM GENÓTIPOS
DE *Coffea canephora*: DIVERGÊNCIA GENÉTICA E RELAÇÃO
COM O DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO**

ANGÉLICA TOMAZELI DA SILVA

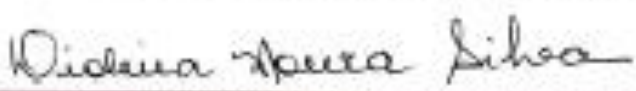
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020.


Comissão Examinadora:



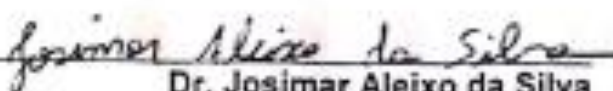
Prof. Dr. Paulo Cezar Cavatte (UFES)
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora



Prof. Dr. Diolina Moura Silva (UFES)
Examinadora Titular Interna



Prof. Dr. Mário Luis Garbin (UFES)
Examinador Titular Externo



Dr. Josimar Aleixo da Silva
Examinador Titular Externo

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Elisa e Jovenilo,
pela educação e amor.*

*Aos meus irmãos, Izael e Giovanin,
pelo apoio incondicional.*

A Thais, pelo companheirismo e carinho

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, em quem sempre busquei forças e conforto, e quem sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida, me orientando e conduzindo.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo, em especial ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) pelo espaço físico e os conhecimentos adquiridos durante esta etapa da minha formação.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço aos meus pais, Elisa e Jovenilo, que nunca mediram esforços para minha formação. Se eu cheguei até aqui foi porque vocês me ajudaram. Muito obrigada por tudo. E aos meus irmãos, Izael e Giovanin, que me ajudaram sempre quando precisei. Amo demais vocês. Agradeço também a toda a minha família que esteve comigo sempre, em especial ao meu avô Alvinho que nos deixou recentemente, mas que sempre estará no meu coração.

Agradeço a Thais pelo apoio incondicional, e por sempre acreditar que eu seria capaz, mesmo quando nem eu mesma acreditava. Obrigada pelos conselhos, pelo carinho, compreensão, respeito e companheirismo e por nunca me deixar abater pelas dificuldades enfrentadas, e sempre me apoiar em tudo. Você é parte importante de tudo isso.

Agradeço ao meu orientador, Paulo Cezar Cavatte, pela paciência que teve comigo, pelos conselhos, ensinamentos, orientação e pela confiança depositada em mim para a execução deste projeto. Aprendi muito durante este período, e agradeço muito por esta oportunidade.

Agradeço aos colegas da pós graduação: Basilio, Kalia, Laiza, Nair, Rosiane, pelos momentos compartilhados de conhecimentos, sofrimentos e principalmente alegrias, que certamente jamais serão esquecidos. E também aos professores do programa pelos ensinamentos que adquiri durante este período.

Agradeço aos colegas e amigos do grupo Ecofisiologia que me ajudaram nos trabalhos de campo e laboratório. Agradeço em especial a Vinicius e Bárbara pela convivência durante as disciplinas, estudos, estágios, campos e laboratório, tudo foi mais fácil com vocês. Agradeço a Josimar pelo apoio nos campos, no laboratório, nas estatísticas e pelos conselhos e toda ajuda oferecida durante a execução do projeto. Agradeço ainda a Jéssica, que esteve comigo no meu dia a dia, aguentando meus dramas, e também aguentando a vida de “escravinha” nas viagens rsrs... Obrigada por tudo. Você tem um coração gigante, e sempre estará guardada no meu. Os dias no laboratório certamente eram mais alegres com você.

Agradeço também ao Laboratório de Botânica (LaBot) da UFES, no Campus de Alegre, ES, pelo espaço disponível para a execução desta pesquisa. E também aos laboratórios de Bioquímica e Biologia Molecular, Bromatologia e Nutrição Animal, Fisiologia e Nutrição Mineral de Plantas, (UFES – Alegre) onde realizei parte de minhas análises.

Agradeço ainda aos professores e servidores que apoiaram e prestaram auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa (Marcia Flores, José Francisco, Soninha, Euziane) e aos demais que não citei nomes.

A todos vocês muito obrigada!

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lavoura onde foi realizado o estudo de diversidade genética, localizada na Fazenda Experimental Bananal do Norte, Incaper, Distrito de Pacotuba, município de Cachoeiro de Itapemirim (20°45' S; 41°17' W), sul do estado do Espírito Santo.....	29
Figura 2: Determinação dos índices de pigmentos (ICTD, IFLA, IANT) e IBN através do clorofilômetro portátil Dualex (Force-A, Orsay, França), em genótipos de <i>C. canephora</i>	30
Figura 3: Determinação da área foliar unitária utilizando o integrador de área foliar (Li-3100C Area Meter, LiCor, Lincoln, EUA), que permite a estimativa da área foliar em tempo real. (A) Integrador de área foliar. (B) Folha de <i>C. canephora</i> sendo passada pelo scanner para determinação de área foliar.....	30
Figura 4: Coleta dos discos foliares, com auxílio de um coletor de discos foliar, em genótipos de <i>C. canephora</i> para determinação da área foliar específica.....	31
Figura 5: Determinação dos índices de pigmentos com a utilização de clorofilômetros portáteis, ClorofiLOG (A) e Dualex (B), em genótipos de <i>C. canephora</i>	34
Figura 6: Determinação de parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i> com a utilização do analisador de gases a infravermelho (IRGA, Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, EUA, 1996).	35
Figura 7: Coleta dos discos foliares com utilização de um coletor de discos foliares para as análises bioquímicas e morfológicas em genótipos de <i>C. canephora</i>	36
Figura 8: Equipamentos utilizados para o processo de secagem, maceração e armazenamento das amostras foliares para as análises bioquímicas em genótipos de <i>C. canephora</i> . (A) Liofilizador; (B) Disruptor celular Magna Lyser Roche; (C) dessecador.....	37
Figura 9: Amostras para determinação de pigmentos cloroplastídicos em genótipos de <i>C. canephora</i> (A) lidas em espectrofotômetro (B) nos comprimentos de onda 470 nm, 647 nm e 663 nm.....	38
Figura 10: Amostras para determinação de fenóis solúveis totais (FST) em genótipos de <i>C. canephora</i> (A) lidas em espectrofotômetro (B) em comprimento de onda de 760 nm.	39

Figura 11: Trituração das amostras em moinho de facas tipo willey, para a determinação da concentração de N e P.	40
Figura 12: Dendrograma representativo da divergência genética entre 40 genótipos de <i>C. canephora</i> obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando a distância generalizada de Mahalanobis e ponto de corte significativo a aproximadamente 60%.....	42
Figura 13: Intensidade da coloração verde foliar de genótipos de <i>C. canephora</i> ordenados de forma decrescente de acordo com a estimativa dos índices de clorofila determinados pelos clorofilômetros portáteis. Fotos ilustrando a divergência na intensidade de coloração verde foliar dos genótipos.	46
Figura 14: Relação entre os índices de clorofila total obtidos com clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG CFL 1030, Falker; Dualex Scientific, Force-A) e por meio de análises bioquímicas. (A) e (C) clorofila total expressa em base de área; (B) e (D) clorofila total expressa em base de massa. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.....	47
Figura 15: Relação clorofila “a” e “b” determinadas com clorofilômetro portátil ClorofiLOG e análises bioquímicas em genótipos de <i>C. canephora</i> . (A) e (B) índice de clorofila “a” e concentração de clorofila “a” expresso em base de área e massa, respectivamente; (C) e (D) índice de clorofila “b” e concentração de clorofila “b” expresso em base de área e massa, respectivamente. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.....	48
Figura 16: Relação, expressa em base de área, entre análises de regressões obtidas com os índices determinados por meio da utilização do clorofilômetro portátil Dualex e as concentrações de clorofila “a” e “b” obtidos por metodologias bioquímicas em genótipos de <i>C. canephora</i> . (A), (C) e (E), relação Dualex/ Cl a; (B), (D) e (F), relação Dualex /Cl b. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.	49
Figura 17: Relação, expressa em base de massa, entre análises de regressões obtidas com os índices determinados com a utilização do Dualex e as concentrações de clorofila “a” e “b” obtidos por metodologias bioquímicas em genótipos de <i>C. canephora</i> . (A), (C) e (E), relação Dualex /Cl a; (B), (D) e (F), relação Dualex /Cl b. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.	50

Figura 18: Relação entre os índices de clorofila determinados com o ClorofiLOG e a concentração de nitrogênio total determinado por metodologias bioquímicas em genótipos de <i>C. canephora</i> . (A), (C) e (E), resultados expressos em base de área; (B), (D) e (F), resultados expressos em base de massa. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.....	51
Figura 19: Relação entre os índices determinados com o Dualex e a concentração de nitrogênio total determinadas por meio de análises bioquímicas em genótipos de <i>C. canephora</i> . (A), (C) e (E), resultados expressos em base de área; (B), (D) e (F), resultados expressos em base de massa. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.....	52
Figura 20: Relação entre o índice de balanço de nitrogênio (IBN) estimado com o Dualex e a concentração de nitrogênio total determinado por meio de análises bioquímicas em genótipos de <i>C. canephora</i> . (A) resultados expressos em base de área; (B), resultados expressos em base de massa. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.....	53
Figura 21: Relação entre os índices estimados pelos clorofilômetros portáteis e os parâmetros de transmitância foliar determinados com o IRGA em genótipos de <i>Coffea canephora</i> . (A), (C), (E) e (G), índices estimados com o Dualex; (B), (D) e (E), índices estimados com o ClorofiLOG. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genótipos de <i>C. canephora</i> utilizados para estudo de diversidade genética mediante intensidade da coloração verde foliar.....	28
Tabela 2: Genótipos de <i>C. canephora</i> utilizados para análises de pigmentos cloroplastídicos, Nitrogênio (N), Fósforo (P), Fenóis Solúveis Totais (FST) e desempenho fotossintético.....	33
Tabela 3. Contribuição relativa dos caracteres - área foliar unitária (AFU), área foliar específica (AFE), índice de clorofila total (ICTD), índice de flavonoides (IFLA), índice de antocianinas (IANT) e índice de balanço de nitrogênio (IBN) - para diversidade de Singh (1981), determinados através da Distância Generalizada de Mahalanobis em genótipos de <i>C. canephora</i>	41
Tabela 4. Caracteres morfofisiológicos - área foliar unitária (AFU), área foliar específica (AFE), índice de clorofila total (ICTD), índice de flavonoides (IFLA), índice de antocianinas (IANT) e índice de balanço de nitrogênio (IBN) – avaliados em genótipos de <i>C. canephora</i> . Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos formados (Teste de Scott-knot $P < 0.05$).....	43
Tabela 5: Índices de pigmentos avaliados com a utilização de clorofilômetros portáteis (ClorofiLog e Dualex) em genótipos de <i>Coffea canephora</i> . Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....	44
Tabela 6: Características avaliadas através de metodologias bioquímicas e morfofisiológicas em genótipos de <i>C. canephora</i> . Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.	45
Tabela 7: Equações de calibração significativas para os índices (IBN e IANT) determinados com o clorofilômetro portátil Dualex e as concentrações bioquímicas de CAR e FST. As equações convertem os índices determinados com o Dualex em concentrações de CAR e FST. Equações de calibração expressas em base de massa e área.....	55
Tabela 8: Equações de calibração não significativas determinadas em genótipos de <i>C. canephora</i> utilizando clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG e Dualex). Equações expressas em base de área e massa.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFE	Área Foliar Específica
AFU	Área Foliar Unitária
Cl_a	Clorofila <i>a</i>
Cl_b	Clorofila <i>b</i>
CT	Clorofila Total
CAR	Carotenoides Totais
ET	Eficiência de Transpiração
ETR	Taxa de Transporte de Elétrons
FSII	Fotossistema II
FST	Fenóis Solúveis Totais
IBN	Índice de Balanço de Nitrogênio
IC	Índice de Colheita
ICT	Índice de Clorofila ClorofiLOG
IC_a	Índice de Clorofila <i>a</i>
IC_b	Índice de Clorofila <i>b</i>
ICTD	Índice de Clorofila Total Dualex
IFLA	Índice de Flavonoides
IAN	Índice de Antocianinas
N	Nitrogênio Total
P	Fósforo Total
PAR	Radiação Fotossinteticamente Ativa
T	Transpiração
TRA	Transmitância Foliar

RESUMO

A seleção de genótipos com desempenho fotossintético superior é fundamental para a obtenção de ganhos substanciais em programas de melhoramento genético, visto que a compreensão sobre os aspectos fisiológicos do cafeeiro, refletidos no desempenho fotossintético, pode contribuir para o aumento da produtividade da cultura. No entanto, para caracterização dos fenótipos (fenotipagem), as principais metodologias empregadas ainda são realizadas de forma destrutiva, laboriosas, fazendo uso de equipamentos de alto custo, demandando muito tempo nas análises, espaço e recursos. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho: i) estudar a divergência genética da intensidade da coloração verde foliar em genótipos de *C. canephora*, e ii) relacionar a intensidade da coloração verde foliar com o desempenho fotossintético em genótipos de *C. canephora*, como forma de potencializar a fenotipagem em larga escala de indivíduos que apresentem capacidade fotossintética superior. Para tal, inicialmente foram avaliados 40 genótipos de *C. canephora* cultivados sob condições de campo. Com auxílio de um clorofilômetro portátil, estimou-se em folhas, de forma não destrutiva, índices de clorofila total, flavonoides, antocianinas e balanço de nitrogênio. As áreas foliares específica e unitária também foram determinadas. A partir dos resultados obtidos constatou-se diferença significativa entre os genótipos para as características avaliadas, exceto para área foliar específica. Os genótipos foram dispostos em quatro grupos distintos com base nas distâncias genéticas. O índice de clorofila total apresentou a maior contribuição para a divergência genética. A relação da intensidade da coloração verde foliar com o desempenho fotossintético foi estudada nos seis genótipos mais divergentes. Para tal, foi determinado em campo, de forma não destrutiva, com a utilização de clorofilômetros portáteis, os índices de pigmentos. Nas mesmas folhas também foram determinadas a transmitância foliar e a taxa de transporte de elétrons. Posteriormente, as folhas foram coletadas para determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos, fenóis solúveis totais, nitrogênio, fósforo e área foliar específica. A intensidade da coloração verde foliar, determinada de forma não destrutiva com clorofilômetros portáteis, apresentou relação significativa com a concentração de pigmentos, nitrogênio e transmitância foliar. Em *C. canephora*, a utilização de clorofilômetros portáteis pode ser utilizada

como ferramenta para seleção de genótipos que apresentem desempenho fotossintético superior.

Palavras-chave: Café conilon. clorofilog. dualex. ecofisiologia. fluorescência.

ABSTRACT

The selection of genotypes with superior photosynthetic performance is essential for obtaining substantial gains in breeding programs, since understanding about the physiological aspects of coffee, reflected in photosynthetic performance, can contribute to increasing crop productivity. However, for the characterization of phenotypes (phenotyping), the main methodologies employed are still carried out in a destructive, laborious way, using high cost equipment, demanding a lot of time in the analysis, space and resources. The objectives of this work were: i) to study the genetic divergence of the green leaf color intensity in *C. canephora* genotypes, and ii) to relate the intensity of leaf green coloration with photosynthetic performance in *C. canephora* genotypes, as a way to potentiate large-scale phenotyping of individuals with superior photosynthetic capacity. 40 genotypes of *C. canephora* cultivated under field conditions were initially evaluated. With the aid of a portable chlorophyll meter, it was estimated in leaves, in a non-destructive way, total chlorophyll indices, flavonoids, anthocyanins and nitrogen balance. The specific and unitary leaf areas were also determined. From the results obtained, a significant differences were found between the genotypes for the evaluated characteristics, except for specific leaf area. The genotypes were arranged in four distinct groups based on genetic distances. The total chlorophyll index showed the greatest contribution to genetic divergence. The relationship between the intensity of green leaf color and photosynthetic performance was studied in the six most divergent genotypes. For this, it was determined in the field, in a non-destructive way, using portable chlorophyll meters, the pigment indexes. Leaf transmittance and electron transport rate were also determined on the same leaves. Subsequently, the leaves were collected to determine the concentration of photosynthetic pigments, total soluble phenols, nitrogen, phosphorus and specific leaf area. The intensity of the green leaf color, determined in a non-destructive way with portable chlorophyll meters, showed a significant relationship with the concentration of pigments, nitrogen and leaf transmittance. In *C. canephora*, the use of portable chlorophyll meters can be used as a tool for the selection of genotypes that present superior photosynthetic performance.

Keywords: Conilon coffee. chlorophyll. dualox. ecophysiology. fluorescence.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVO GERAL	26
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
<i>Experimento 1</i>	27
4.1. Área de estudo, material biológico e desenho experimental.....	27
4.2 Determinação dos índices de pigmentos	29
4.3 Área foliar unitária.....	30
4.4 Área foliar específica.....	31
4.5 Análises estatísticas.....	31
<i>Experimento 2</i>	32
4.6 Área de estudo, material biológico e desenho experimental.....	32
4.7 Determinação de características não destrutivas	33
4.7.1 Determinação de índices de pigmentos.....	33
4.7.2 Análise de emissão da fluorescência da clorofila a.....	34
4.8 Determinação de características destrutivas	36
4.8.1 Características morfológicas.....	36
4.8.2 características bioquímicas.....	37
4.8.2.1 Pigmentos cloroplastídicos	37
4.8.2.2 fenóis solúveis totais	38
4.8.2.3 Nitrogênio e fósforo.....	39
4.9 Análises estatísticas.....	40
5. RESULTADOS.....	41
<i>Experimento 1</i>	41
<i>Experimento 2</i>	43
5.1 Índices de pigmentos determinados com clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG e Dualex) e caracteres bioquímicos e morfofisiológicos em genótipos de <i>C. canephora</i>	43
5.2 Relações obtidas através de regressões lineares entre as variáveis não destrutivas e destrutivas em genótipos de <i>C. canephora</i>	46
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

9. ANEXO	75
----------------	----

1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro é um arbusto perene, pertencente ao gênero *Coffea* na família botânica Rubiaceae (BERTHAUD; CHARRIER, 1988), com ocorrência tanto em climas tropicais quanto subtropicais. Atualmente, são reconhecidas cerca de 124 espécies de café (DAVIS *et al.*, 2011), sendo a produção mundial proveniente de duas espécies principais: *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Café conilon) e *Coffea arabica* L. (Café arábica) (FERRÃO *et al.*, 2007a). Ambas as espécies apresentam como habitats naturais as regiões tropicais do continente africano, evoluindo naturalmente como vegetação de sub-bosque (BERTHAUD; CHARRIER, 1988).

Até o século XIX, a produção de café no Brasil era proveniente apenas da espécie *C. arabica*. Entretanto, a partir do final do século XIX, *C. canephora* começou a ser estudado visando sua exploração econômica, visto que esta espécie se mostrou resistente à ferrugem, uma doença que estava afetando substancialmente os plantios de café arábica (CHARRIER; BERTHAUD, 1985). Nos últimos anos, a produção de café conilon vem crescendo muito no país, comparando-se com o café arábica. Com a compilação da safra de 2018/2019, obteve-se produção de 49,31 milhões de sacas, sendo 34,30 milhões de sacas de café arábica e 15,01 milhões provenientes de café conilon, representando 5,9% de crescimento da produção de conilon em relação à safra anterior (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2019).

O Espírito Santo é o estado brasileiro maior produtor de *C. canephora* e também o que possui maior área plantada da cultura. A safra capixaba de 2018/2019 foi de 10,5 milhões de sacas, respondendo a aproximadamente 70% da produção brasileira total de café conilon (CONAB, 2019). Assim a cafeicultura é uma das atividades agroindustriais de grande destaque para o setor econômico do Espírito Santo, tendo função importante e notória no desenvolvimento tanto econômico quanto social, assegurando geração de empregos, fixação do homem no campo, bem como arrecadação de impostos (FERRÃO *et al.*, 2017).

A espécie *C. canephora* é encontrada naturalmente em florestas equatoriais de terras baixas, desde a Guiné até Uganda. A ocorrência da espécie *C. arabica* é restrita às florestas dos planaltos do sudoeste da Etiópia (BERTHAUD; CHARRIER, 1988). Em função do local de origem e como forma de reproduzir as condições de

seus habitats naturais, as primeiras lavouras foram cultivadas em associação com arbóreas, e desta forma mantinham o cafeeiro sob sombreamento (DAMATTA *et al.*, 2007a). No entanto, conforme observado por Rodríguez-López, *et al.* (2012), *C. canephora* apresenta capacidade de aclimatação a ambientes com diferentes disponibilidades de radiação, característica que possibilitou que as primeiras lavouras comerciais instaladas no Brasil na década de 1960 fossem implantadas diretamente a pleno sol (DAMATTA *et al.*, 2007b). Assim, o cultivo do café conilon realizado tradicionalmente sem associação com arbustos ou arbóreas (CAVATTE *et al.*, 2013) apresenta produção satisfatória, e, na maioria das vezes, superior aos plantios sombreados (DAMATTA, 2004).

As primeiras lavouras de café conilon começaram a ser cultivadas no estado por volta da década de 1950, tendo como finalidade o cultivo às margens da lavoura do café arábica. Atualmente a cultura está presente em 65 dos 78 municípios do estado (FASSIO; SILVA, 2007), com uma área cultivada de 2,16 milhões de hectares. A área destinada a cultura de café conilon é de 393,9 mil hectares (CONAB, 2019), sendo este utilizado especialmente para produção de *blends* com café arábica e como café solúvel, sem causar interferências na qualidade da bebida (FERRÃO *et al.*, 2007b).

A baixa disponibilidade hídrica no solo associada com elevadas temperaturas atmosféricas apresentadas nos últimos anos no Espírito Santo, promoveu decréscimos significativos na produção do café conilon. Sabe-se que a seca é o principal estresse ambiental responsável por reduzir a produção do cafeeiro (DAMATTA, 2004).

Considerando a importância da cultura para o Brasil, e, especificamente, para o Espírito Santo, considerando também a instabilidade climática, com reflexos sobre os regimes de chuvas, temperatura, intensificando os efeitos do déficit hídrico e nutricional no cafeeiro, limitando o crescimento das plantas e concomitantemente promovendo quedas na produção, com impactos econômicos e sociais para o país (BRINATE, 2018), faz-se necessário avaliar o desempenho fotossintético, visto que a compreensão dos aspectos fisiológicos do cafeeiro pode contribuir para o aumento da produtividade.

A cafeicultura está enfrentando desafios crescentes diante das alterações climáticas, que incluem aumentos nas temperaturas médias globais além de

aumentos frequentes de eventos climáticos como déficit hídrico (HAWORTH *et al.*, 2018). Tais impactos afetam tanto a produtividade das lavouras como a qualidade da bebida, com impactos significativos no valor desta *commodity* (MARTINS *et al.*, 2016). Em vista disso, a seleção de genótipos mais promissores faz-se de fundamental importância.

Estudos já relatam que a produtividade das culturas por unidade de água tornou-se uma consideração importante em programas de melhoramento genético visando o desenvolvimento de variedades eficientes no uso da água em todo o mundo. No entanto, selecionar genótipos tolerantes ao déficit hídrico não é fácil. Segundo um modelo proposto por Passioura (1977), três componentes são levados em consideração para a seleção: quantidade de água transpirada (T), eficiência de transpiração (ET) – matéria seca produzida por unidade de água transpirada, e índice de colheita (IC), este último já esgotado. Cruickshank *et al.* (2003), relataram como característica mais eficiente para a seleção, indivíduos com maior ET, uma vez que seleções de alto rendimento baseadas em T não seriam vantajosas em ambientes secos. No entanto, selecionar para ET não é fácil em larga escala, por ser uma característica fisiológica complexa. Estudos já relatam que leituras de índices de clorofilas, mediante utilização de clorofilômetros portáteis, e AFE já estão altamente correlacionados com ET (NIGAM; ARUNA, 2008), entretanto devem apresentar variabilidade genética entre os genótipos para possibilitar a seleção de genótipos com desempenho fotossintético superior.

Com o objetivo de aumentar o desempenho produtivo das principais espécies cultivadas, aspectos como a arquitetura da copa e alteração no padrão de alocação de biomassa da planta foram os principais alvos de estudo do melhoramento genético (ZHU *et al.*, 2010). O foco agora visando aumento da produtividade das culturas está voltado para aspectos relacionados a aumentar a eficiência fotossintética visando obtenção de maiores rendimentos de produção da cultura (LONG; ORT, 2010).

A fotossíntese é um processo essencial que gera energia para o crescimento das plantas. Os pigmentos fotossintéticos (clorofilas “a” e “b” e carotenoides), absorvem a energia luminosa e esta é convertida em energia química sob a forma de ATP e NAPH, que serão utilizados no processo fotossintético, produzindo os metabólitos necessários para os eventos fisiológicos (crescimento vegetativo e

reprodutivo) ou, se em excesso, pode ser dissipada como calor ou emitida sob a forma de fluorescência (MAXWELL; JOHNSON, 2000; TAIZ *et al.*, 2017).

As clorofilas são intimamente relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas, tal qual o crescimento e adaptabilidade a ambientes distintos (JESUS; MARRENCO, 2008). Uma planta que apresenta maiores concentrações de clorofilas pode apresentar, concomitantemente, taxas fotossintéticas mais elevadas (CASTRO *et al.*, 2014). Concentrações foliares de clorofilas estão diretamente relacionadas às concentrações de nitrogênio foliar (N) (EVANS, 1989; LAMBERS *et al.*, 2008), sendo este nutriente essencial também para a manutenção do processo fotossintético, visto que são constituintes das moléculas de clorofila (PETERSON, *et al.*, 1993), além de comporem moléculas de proteínas fotossintéticas como RubisCO.

A intensidade do verde foliar, ou especificamente a concentração de clorofilas, se correlaciona positivamente com as concentrações de N, e este por sua vez correlaciona-se positivamente com as taxas fotossintéticas. Portanto o desempenho fotossintético está relacionado de forma intrínseca à concentração de pigmentos fotossintéticos foliares (CAVATTE *et al.*, 2016).

As metodologias para determinação da concentração de clorofilas são sempre baseadas na destruição do material vegetal e na utilização de solventes orgânicos (LICHTHENTHALER; WELLBURN, 1983; LICHTHENTHALER 1987), carecendo do transporte imediato das amostras até o laboratório. Durante o processo de extração e transporte, alterações substanciais na concentração de pigmentos podem ocorrer, levando à alta variabilidade dos dados (NETTO *et al.*, 2005; MIELKE *et al.*, 2012). Dessa forma, surgem metodologias alternativas que permitem estimar índices de pigmentos fotossintéticos sem necessidade da destruição do material vegetal, de forma mais rápida e menos onerosa, por meio de clorofilômetros portáteis (MIELKE *et al.*, 2012). Dentre os principais, citam-se o ClorofiLOG (CFL 1030, Falker), o Dualex (Scientific, ForceA) e SPAD (502, Konica minolta).

As características foliares dos genótipos de *C. canephora* variam muito e são extremamente úteis na identificação de plantas com características desejáveis, podendo ser inclusive utilizadas para auxiliar na escolha de genótipos com maior potencial fotossintético (DUBBERSTEIN, 2019). As características foliares dos

genótipos devem ser consideradas no processo de seleção (SCHMILDT *et al.*, 2014), pois permite aferir sobre alguns parâmetros fisiológicos possibilitando a obtenção de conhecimentos sobre a produtividade das culturas (BRINATE *et al.*, 2015).

A intensidade do verde foliar apresentada pelos genótipos é característica importante para estimar índices de pigmentos fotossintéticos, visto que quanto mais verde o tecido foliar, maiores serão os valores estimados pelos equipamentos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2019). Qualquer alteração na intensidade de coloração verde foliar pode acarretar em comprometimentos ao processo fotossintético, comprometendo assim a produção de culturas agrícolas (PAIXÃO, 2018).

Essa diferença na intensidade da coloração verde foliar pode ser utilizada como objeto de estudo para se estimar concentrações de clorofilas empregando-se metodologias não destrutivas, como a utilização de clorofilômetros portáteis (BERG; PERKINS, 2004), podendo contribuir como ferramenta ao aperfeiçoamento no processo de fenotipagem.

Dentre os métodos de fenotipagem, destacam-se as análises de parâmetros fotossintéticos, por meio da utilização de clorofilômetros portáteis, que permitem a mensuração de pigmentos fotossintéticos de forma não destrutiva (BERG; PERKINS, 2004), e análise da fluorescência da clorofila *a*, que, devido a sua praticidade, possibilita a comparação de um grande número de tratamentos (OUKARROUM *et al.*, 2004; KALAJI *et al.*, 2018).

A utilização de clorofilômetros portáteis é uma alternativa ao processo de fenotipagem, que vem passando por aperfeiçoamentos, pois é uma metodologia não destrutiva que possibilita a obtenção de resultados de forma mais rápida e a avaliação de um número maior de amostras em um menor intervalo de tempo (CHEN *et al.*, 2011; FURBANK; TESTER, 2011).

Clorofilômetros portáteis já vêm sendo utilizados para diferentes culturas, destacando-se o café conilon (NETO *et al.*, 2005), o algodão (BRITO *et al.*, 2011), a lichia (FU *et al.*, 2013), além de espécies arbóreas (RICHARDSON *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2016). Desta forma é uma alternativa, portanto, para auxiliar na discriminação de genótipos, visto que características foliares podem ser consideradas no processo de seleção (SCHMILDT *et al.*, 2014), pois permite aferir

sobre alguns parâmetros fisiológicos, possibilitando a obtenção de conhecimento sobre a produtividade da cultura (BRINATE *et al.*, 2015).

O ClorofiLOG, utiliza fotodiodos que emitem três comprimentos de onda, dois dentro da banda do vermelho, próximos aos picos de absorção de cada tipo de clorofila (635 e 660 nm) e outro no infravermelho próximo (880 nm), e possui um sensor inferior que capta a radiação transmitida através da folha. Desta forma, pela emissão de tais comprimentos de onda, permite a estimação do índice de clorofila a (ICa), índice de clorofila b (ICb) bem como índice de clorofila total (ICTC). Para tal, a luz que passa através da amostra da folha atinge um receptor que converte a luz transmitida em sinais elétricos analógicos. Esses sinais são convertidos em digitais, e usados por um microprocessador para estimar os índices, em unidades adimensionais, de clorofilas, proporcionais aos teores de clorofila a, b e total presentes na amostra foliar (FALKER, 2008).

O Dualex scientific, por sua vez, permite estimar índice de clorofila total (ICTD), índice de flavonoides (IFLA), índice de antocianinas (IANT) além de índice de balanço de nitrogênio (IBN), este último é obtido através da razão ICTD/IFLA, por meio da medição de absorção da luz ultravioleta da epiderme foliar pela excitação dupla da fluorescência da clorofila. Para tal, possui um fotodiodo de silício, emitindo feixe de luz nos comprimentos de onda de 375 nm e outro de referência a 650 nm, que penetra na epiderme da folha. A emissão de luz nos comprimentos de onda do infravermelho são de baixa absorção pelas clorofilas, sendo utilizado para compensar a espessura foliar, bem como o conteúdo de água da folha (GOULAS *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2012; FORCEA, 2018), fatores que podem alterar substancialmente as leituras.

Além de estimar índices de pigmentos fotossintéticos, outro parâmetro não destrutivo, e que permite inferir sobre o desempenho fotossintético, é a técnica de análise da fluorescência da clorofila *a*, que possibilita avaliar a eficiência quântica da transferência de elétrons pelo fotossistema II (FSII) de forma rápida e não destrutiva, fornecendo uma gama de informações referentes à estrutura e funcionamento do aparato fotossintético, desde a absorção da energia luminosa pelos complexos antena até a transferência de energia entre os fotossistemas I (FSI) e II (FSII) (STIRBET *et al.*, 2018).

Aproximadamente 90% da fluorescência origina-se da clorofila *a* do FSII, espelhando os processos primários fotossintéticos como captação de luz, distribuição e transferência de energia de excitação para produzir intermediários necessários ao processo fotossintético (KRAUSE; WEISS, 1991). Visto a relação do FSII com os demais componentes da maquinaria fotossintética, a emissão de fluorescência é um indicador indireto do processo fotossintético (MAFEI, 2009), permitindo o estudo das características relacionadas à capacidade de absorção da energia luminosa e a transferência desta na cadeia de transporte de elétrons (KRAUSE; WEISS, 1991).

Se a fotossíntese e a fotorrespiração não utilizarem a maior fração do poder redutor que é produzido na fase fotoquímica, pode ocorrer uma sobre redução da cadeia de transporte de elétrons, podendo estes daí escaparem levando à formação de espécies reativas de oxigênio potencialmente capazes de resultar em danos fotooxidativos (LIMA *et al.*, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2004), conhecidos como escaldadura. Desta forma, maior concentração de fenóis no tecido foliar pode contribuir para proteção contra excesso de energia e danos associados a radiação (GILL; TUTEJA, 2010; WILHELM; SELMAR, 2011).

O café conilon, mesmo com sua rusticidade e boa adaptação às condições edafoclimáticas do Espírito Santo, em regiões mais secas, apresenta queda significativa no crescimento inicial das mudas, bem como na produtividade e na qualidade da bebida (FERRÃO *et al.*, 2017).

Visto isso, e a demanda crescente por alimentos e incrementos da produção, tem-se como propósito a indicação de genótipos de *C. canephora* com características desejáveis à programas de melhoramento genético visando, por exemplo, a tolerância a seca, além da seleção, mediante metodologias não destrutivas, de genótipos com capacidade fotossintética superior. E tais metodologias, por permitirem análises mais rápidas e de um número maior de amostras, sem comprometer a integridade do tecido vegetal, podem contribuir para a seleção de genótipos com divergência genética entre caracteres morfofisiológicos para estudos complementares visando a seleção de genótipos promissores com eficiência fotossintética superior.

2. OBJETIVO GERAL

Determinar a divergência genética da intensidade da coloração verde foliar e relacionar a intensidade da coloração verde foliar com o desempenho fotossintético em genótipos de *C. canephora*, possibilitando a fenotipagem em larga escala de indivíduos com capacidade fotossintética superior.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a divergência genética em genótipos de *C. canephora* mediante índices de pigmentos (ICTD, IFLA e IANT) e IBN determinados com clorofilômetro portátil Dualex, e caracteres morfológicos (AFU, AFE).
- Determinar, por meio de metodologias não destrutivas, índices de pigmentos fotossintéticos (ICa, ICb, ICTC, ICTD), IFLA, IANT, IBN, e parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em genótipos de *C. canephora*.
- Quantificar, por meio de análises bioquímicas, concentrações de clorofilas (clorofila *a*, *b* e total), nitrogênio total, fósforo bem como fenóis solúveis totais em genótipos de *C. canephora*.
- Relacionar, por meio de regressões lineares, a intensidade da coloração verde foliar com o desempenho fotossintético em genótipos de *C. canephora*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Experimento 1

4.1. Área de estudo, material biológico e desenho experimental

O experimento foi desenvolvido sob condições de campo na Fazenda Experimental do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) Bananal do Norte, localizada no distrito de Pacotuba, município de Cachoeiro de Itapemirim (20°45' S; 41°17' W), sul do estado do Espírito Santo, Brasil. A altitude da região é de 140 m e o solo do local foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, sendo o clima classificado como Cwa, com verão chuvoso e inverno seco, de acordo com a classificação de Köpen. A região apresenta precipitação pluvial anual de 1.200 mm, temperatura média anual de 23°C e topografia ondulado-acidentada. A lavoura avaliada foi implantada em 2016 em espaçamento de 3,00 x 1,20 m com sistema de irrigação por gotejamento, e os tratos culturais e fitossanitários estabelecidos segundo recomendações para a cultura no estado. Para as avaliações utilizaram-se 40 genótipos de *C. canephora* (Tabela 1) mais produtivos nos ensaios realizados pelo Incaper no período de seca (2014 – 2017), que resultaram na variedade 'Conquista ES8152', nova cultivar de café conilon lançada pelo Incaper. Os genótipos são cultivados em delineamento estatístico inteiramente casualizado, em sistema de linhas. Para as análises utilizaram-se cinco indivíduos de cada genótipo (cinco repetições) (Figura 1).

Tabela 1. Genótipos de *C. canephora* utilizados para estudo de diversidade genética mediante intensidade da coloração verde foliar.

Nº do genótipo*	Denominação do genótipo	Nomenclatura do genótipo
2	104 A – 225 dias**	Clone variedade 8111
3	232/97 – 230 dias	Incaper 101P (2 – JC Diamante)
4	82 OS – 234 dias	Parc. 82 Exp. Precoce Sul FEBN
5	02/86 – 245 dias	12 V. Incaper 105 (8 - JC Diamante)
6	74 OS – 245 dias	Incaper 104 P (7 – JC Diamante)
7	31/93 – 245 dias	10 V (JC Vitória, FEBN)
8	48/89 – 248 dias	Incaper 106 P (6 – JC Diamante)
9	54 OS – 250 dias	Parc. 54 Exp. Precoce Sul FEBN
10	2 B/89 – 250 dias	Bulcubense (4 - JC Diamante)
11	03/86 – 250 dias	Clone 02 Robustão Capixaba
12	41 OS – 252 dias	Incaper 107 P (1 JC Diamante)
13	15. Parc. 66 RG – 252 dias	Incaper 109 P (15 – JC Diamante)
14	A1 – Ivan Milanez – 255 dias	Incaper 108 P (9 – JC Diamante)
15	LB1 (Damião) – 265 dias	201 (17 – JC Jequitibá)
16	105/89 – 270 dias	25 – JC Jequitibá
17	24/93 – 275 dias	9 V (JC Vitória, FEBN)
18	83 – 280 dias	3V (JC Vitória, FEBN)
19	120/86 – 280 dias	6 JC Robustão Capixaba (FEBN)
20	748/97 – 281 dias	31 – JC Jequitibá
21	671/97 – 283 dias	Incaper 2013 I (30 – JC Jequitibá)
22	77/87 – 284 dias	4 V (JC Vitória, FEBN)
23	Rec. Par. 6 (Romarinho) – 287 dias	Incaper 204 I (34 – JC Jequitibá)
24	73/87 – 288 dias	2V (JC Vitória, FEBN)
25	52 IS – 291 dias	Parc. 52 Exp. Intermediário Sul FEBN
26	01 IS – 293 dias	Incaper 209 (43 – JC Jequitibá)
27	60 IS – 298 dias	Parc. 60 Exp. Intermediário Sul FEBN
29	656/97 – 289 dias	36 – JC Jequitibá
30	32/89 – 291 dias	Incaper 301 T (42 – JC Centenária)
31	03 AVCAS – 296 dias	Incaper 303 T (44 – JC Centenária)
32	02 AVCAS – 297 dias	Incaper 304 T (45 – JC Centenária)
33	04/93 – 299 dias	Incaper 208 – 47 – JC Jequitibá
34	143/86 – 300 dias	Incaper 306 T (50 – JC Centenária)
35	76/87/1 – 300 dias	5V 9 JC Vitória, FEBN)
36	76/89 – 305 dias	Incaper 308 JC Centenário
37	153 – 305 dias	13 V, Incaper 307 (T44 – JC Centenária)
38	Verdin – 282 dias	FEM, Experimento 40 anos
39	P1 – 300 dias	FEM, Experimento 40 anos
40	P2 – 280 dias	FEM, Experimento 40 anos
46	Clone 153 (22)	Planta 22, Clone 153, População tardia
47	Clone 139 (22)	Planta 22, Clone 139, População tardia

*Numeração dos genótipos de acordo com as parcelas dispostas em campo.

** Período de maturação



Figura 1: Lavoura onde foi realizado o estudo de diversidade genética, localizada na Fazenda Experimental Bananal do Norte, Incaper, Distrito de Pacotuba, município de Cachoeiro de Itapemirim (20°45' S; 41°17' W), sul do estado do Espírito Santo.

4.2 Determinação dos índices de pigmentos

As análises de pigmentos foram realizadas no período de 8:30-12:00 hs. Para as análises de pigmentos fotossintéticos foram selecionadas seis folhas, totalmente expandidas, do terceiro ou quarto par contadas a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, localizados no terço médio de cada indivíduo. Foram realizadas duas aferições em cada lado da nervura central, no terço médio de cada folha com o aparelho, considerando-se para as análises a média das estimativas. Em cada folha, com a utilização do clorofilômetro portátil Dualex (Force-A, Orsay, França) estimou-se índices de pigmentos (clorofila total (ICTD), flavonoides (IFLA), antocianinas (IANT)) e índice de balanço de nitrogênio (IBN) (Figura 2). Após as determinações dos índices de pigmentos fotossintéticos, as mesmas folhas foram coletadas em sacolas plásticas transparentes, acondicionados em isopor com gelo e levadas até o Laboratório de Botânica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS), da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre-ES, Brasil, onde foi determinada a Área Foliar Unitária. As análises foram realizadas no período de granação.



Figura 2: Determinação dos índices de pigmentos (ICTD, IFLA, IANT) e IBN através do clorofilômetro portátil Dualox (Force-A, Orsay, França), em genótipos de *C. canephora*.

4.3 Área foliar unitária

A área foliar unitária (AFU) foi determinada no Laboratório de Botânica do CCENS no mesmo dia e nas mesmas folhas em que foram determinados os índices de pigmentos. Para isso foi utilizado um integrador de área foliar (Li-3100C Area Meter, LiCor, Lincoln, EUA) que funciona em tempo real, sendo a área foliar informada no momento em que a folha passa pelo sensor (LI-COR, 1996) (Figura 3). Cada folha foi passada uma vez pelo sensor para estimativa da AFU.

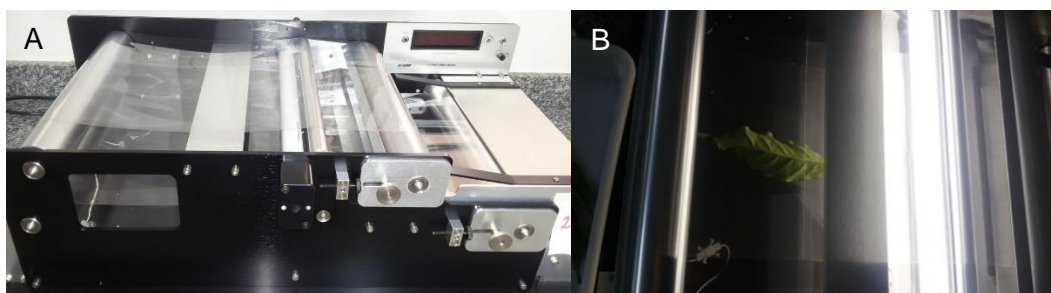


Figura 3: Determinação da área foliar unitária utilizando o integrador de área foliar (Li-3100C Area Meter, LiCor, Lincoln, EUA), que permite a estimativa da área foliar em tempo real. (A) Integrador de área foliar. (B) Folha de *C. canephora* sendo passada pelo scanner para determinação de área foliar.

4.4 Área foliar específica

Para as análises da área foliar específica (AFE) foram selecionadas quatro folhas, totalmente expandidas, do terceiro ou quarto par a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, localizados no terço médio de cada indivíduo. Com auxílio de um coletor de disco foliar com aproximadamente 2 cm² de área, foram coletados quatro discos de cada folha (Figura 4), armazenados previamente para transporte em sacos de papel, levados até o Laboratório de Botânica do CCENS, onde os mesmos foram secos em estufa de circulação forçada de ar à 60 °C. Após 72 h, e a cada 24 h, os discos foram pesados em balança de precisão analítica até atingir massa constante. A área foliar específica (AFE m² kg⁻¹) foi então calculada através da divisão entre a área pela massa seca dos discos (AFE = AF/MS).



Figura 4: Coleta dos discos foliares, com auxílio de um coletor de discos foliar, em genótipos de *C. canephora* para determinação da área foliar específica.

4.5 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e procedimentos multivariados para estimação da divergência genética. A importância de caracteres foi determinada pela avaliação da contribuição relativa de cada característica para a diversidade genética, estimados pelo método de Singh (1981). Foi estimada a distância generalizada de Mahalanobis, para detecção daqueles genótipos mais divergentes. Foi realizado o agrupamento dos genótipos com base nas distâncias, para obtenção do dendrograma, pelo método hierárquico

UPGMA (ligação média entre grupos). A ligação média entre grupos, e o número de grupos foi definido pelo procedimento de Mojena (1977). Posteriormente foi realizado uma nova ANOVA, a partir dos grupos formados, para caracterização dos mesmos. As análises foram realizadas com auxílio do software programa GENES (CRUZ, 2013).

Experimento 2

4.6 Área de estudo, material biológico e desenho experimental

O experimento foi desenvolvido sob condições de campo na Fazenda Experimental do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) Bananal do Norte, localizada no distrito de Pacotuba, município de Cachoeiro de Itapemirim (20°45' S; 41°17' W), sul do estado do Espírito Santo, Brasil. A altitude da região é de 140 m e o solo do local foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, sendo o clima classificado como Cwa, com verão chuvoso e inverno seco de acordo com a classificação de Köpen. A região apresenta precipitação pluvial anual de 1.200 mm, temperatura média anual de 23°C e topografia ondulado-acidentada. A lavoura avaliada foi implantada em 2016 em espaçamento de 3,00 x 1,20 m com sistema de irrigação por gotejamento, e os tratos culturais e fitossanitários estabelecidos segundo recomendações para a cultura no estado. Para as avaliações utilizaram-se seis genótipos de *C. canephora* (Tabela 2) escolhidos por meio de avaliações preliminares utilizando 40 genótipos mais produtivos nos ensaios realizados pelo Incaper no período de seca (2014 – 2017), que resultaram na variedade 'Conquista ES8152', nova cultivar de café conilon lançada pelo Incaper. A seleção dos seis genótipos para o estudo ocorreu mediante análises morfofisiológicas, sendo os genótipos selecionados com base na formação de grupos pelo método de agrupamento UPGMA e com base nas distâncias genéticas. Os genótipos são cultivados em delineamento estatístico inteiramente casualizado, em sistema de linhas. Para as análises utilizaram-se cinco indivíduos de cada genótipo (cinco repetições).

Tabela 2: Genótipos de *C. canephora* utilizados para análises de pigmentos cloroplastídicos, Nitrogênio (N), Fósforo (P), Fenóis Solúveis Totais (FST) e desempenho fotossintético.

Nº do genótipo	Denominação do genótipo	Nomenclatura do genótipo
2	104 A – 225 dias*	Clone variedade 8111
5	02/86 – 245 dias	12 V. Incaper 105 (8 - JC Diamante)
9	54 OS – 250 dias	Parc. 54 Exp. Precoce Sul FEBN
18	83 – 280 dias	3V (JC Vitória, FEBN)
21	671/97 – 283 dias	Incaper 2013 I (30 – JC Jequitibá)
34	143/86 – 300 dias	Incaper 306 T (50 – JC Centenária)

*Período de maturação.

4.7 Determinação de características não destrutivas

4.7.1 Determinação de índices de pigmentos

As avaliações de pigmentos foram realizadas no período de 8:30-12:00 hs. Foram avaliados cinco indivíduos de cada um dos seis genótipos, sendo selecionadas quatro folhas de cada um dos indivíduos, totalmente expandidas, do terço médio, da terceira ou quarta roseta (contadas a partir do ápice) de ramos plagiotrópicos do cafeeiro. Em cada folha, com a utilização de dois clorofilômetros portáteis: ClorofiLOG CFL 1030 (Falker, Rio Grande do Sul, Brasil); Dualex scientific (“dual excitation”, Force-A, Orsay, França) estimaram-se índices de pigmentos fotossintéticos, sendo realizadas duas aferições em cada lado da nervura central, na porção mediana das folhas com cada aparelho, considerando-se para as análises a média das aferições (Figura 5). Com o ClorofiLog foram estimados índice de clorofila a (ICa), índice de clorofila b (ICb) e índice de clorofila total (ICT), já com o Dualex foram estimados índice de clorofila total (ICTD), índice de flavonoides (IFLA), índice de antocianinas (IANT) e índice de balanço de nitrogênio (IBN), este último obtido pela razão ICTD/IFLA.



Figura 5: Determinação dos índices de pigmentos com a utilização de clorofilômetros portáteis, ClorofiLOG (A) e Dualex (B), em genótipos de *C. canephora*.

4.7.2 Análise de emissão da fluorescência da clorofila a

As avaliações de emissão de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas no período de 8:30-12:00 hs sob radiação fotossinteticamente ativa, equivalente ao ambiente, de $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para as análises utilizaram-se as mesmas folhas em que estimou-se os índices de pigmentos com os clorofilômetros portáteis. Foram avaliados cinco indivíduos de cada um dos seis genótipos, sendo selecionadas quatro folhas de cada um dos indivíduos, totalmente expandidas, do terço médio, da terceira ou quarta roseta (contadas a partir do ápice) de ramos plagiotrópicos do cafeeiro. Em cada folha, com a utilização do analisador de gases a infravermelho (IRGA, Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, EUA), e utilizando a câmara de fluorescência integrada 6400-40 (LI-COR Inc., Lincoln, NE, EUA), foi determinado a taxa de transporte de elétrons (ETR), sendo realizadas duas aferições em cada lado da nervura central, na porção mediana das folhas, considerando-se para as análises a média das aferições (Figura 6).

A *ETR* foi estabelecida após determinação dos valores de absorvância foliar. Para tal, para determinar a radiação fotossinteticamente ativa transmitida (***PARo***) e a radiação fotossinteticamente ativa interceptada pela folha (***PARi***), um sensor quântico foi acoplado à base da câmara do IRGA e a intensidade de luz vermelha foi configurada em 1000 mV. A transmitância foliar (TRA) foi então determinada conforme a equação:

$$\text{TRA} = \text{PAR}_o / \text{PAR}_i$$

Posteriormente, a absorvância foliar nos comprimentos de luz vermelha (α_f) e azul (α_b) foi ajustada de acordo com as seguintes equações:

$$\alpha_f = 0.9407 - [0.8836 * (\text{TRA})]$$

$$\alpha_b = 0.9522 - [0.2546 * (\text{TRA})]$$

Para a determinação da absorvância foliar (α_f), foi considerado a proporção de luz azul ($P_B=10\%$) e vermelha ($P_R=90\%$), conforme a fórmula:

$$\alpha_f = (\alpha_b * P_B) + (\alpha_r * P_R)$$

Foi então estabelecido o rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ϕ_{PSII}). Inicialmente, para determinação da fluorescência no estado estacionário (F_s), as folhas foram aclimatadas por 8 segundos a luz, utilizando intensidade de PAR correspondente a $1200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sequencialmente, foi aplicado um pulso de luz saturante $> 6000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para determinar a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m). Utilizando os valores de F_s e F_m , calculou-se o ϕ_{PSII} conforme proposto por Genty *et al.* (1989):

$$\phi_{PSII} = (F_m - F_s) / F_m$$

Para determinação da ETR, considerou-se que 50% da energia absorvida era utilizada pelo fotossistema II ($\beta=0,5$) (Melis *et al.* (1987). A ETR foi então calculada conforme a equação proposta por Genty *et al.* (1989):

$$\text{ETR} = \text{PAR} * \phi_{PSII} * \alpha_f * \beta$$



Figura 6: Determinação de par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia da clorofila a com a utiliza\u00e7\u00e3o do analisador de gases a infravermelho (IRGA, Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, EUA, 1996).

4.8 Determinação de características destrutivas

Após as determinações dos índices de pigmentos e emissão de fluorescência da clorofila *a*, com auxílio de um coletor de discos foliares de aproximadamente 2 cm² de área, discos foliares foram coletados na parte mediana de cada folha evitando-se a nervura central, para análises bioquímicas e morfológicas. Duas folhas foram utilizadas para determinação da área foliar específica (AFE) e duas foram utilizadas para determinação de características bioquímicas. Para as análises morfológicas coletou-se cinco discos foliares de cada folha, já para as bioquímicas sete discos foliares foram coletados de cada uma das folhas.

4.8.1 Características morfológicas

Os discos foram armazenados e transportados em sacos de papel até o Laboratório de Botânica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS) da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre- ES, Brasil, onde os mesmos foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 60°C. Após 72 h, e a cada 24 h, os discos foram pesados em balança de precisão analítica até atingir massa constante. A área foliar específica (AFE m² kg⁻¹) foi então calculada através da divisão entre a área pela massa seca dos discos (AFE=AF/MS) (Figura 7).



Figura 7: Coleta dos discos foliares com utilização de um coletor de discos foliares para as análises bioquímicas e morfológicas em genótipos de *C. canephora*.

4.8.2 características bioquímicas

Os discos foliares foram armazenados para transporte em envelopes de papel alumínio, acondicionados em isopor com gelo e transportados até o Laboratório de Botânica do CCENS - UFES, onde foram levados ao freezer a temperatura de -80°C . Posteriormente as amostras foram liofilizadas por 48 horas e então o material foi armazenado em microtubos de 1,5 mL. Subsequentemente, com a utilização do disruptor celular (Roche, MagNA Lyser), as amostras foram maceradas com aproximadamente 10 esferas de vidro de 2 mm de diâmetro, a 4500 rpm por 60 segundos. O material vegetal macerado foi então mantido em microtubos de 1,5 mL, armazenados em dessecador até a realização das análises bioquímicas (Figura 8).

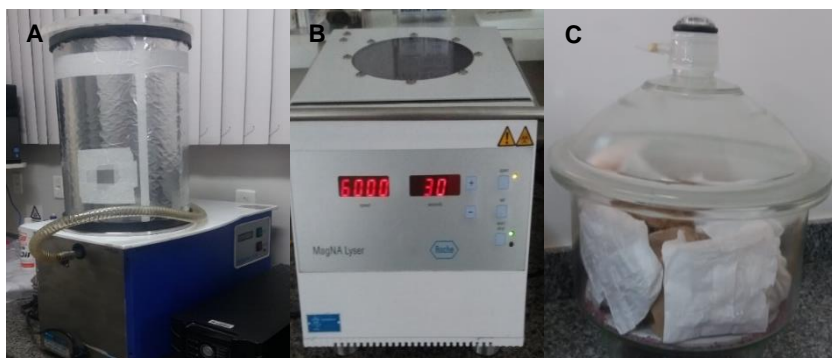


Figura 8: Equipamentos utilizados para o processo de secagem, maceração e armazenamento das amostras foliares para as análises bioquímicas em genótipos de *C. canephora*. (A) Liofilizador; (B) Disruptor celular MagNA Lyser Roche; (C) dessecador.

4.8.2.1 Pigmentos cloroplastídicos

Foi pesado aproximadamente 10 mg do macerado, colocado em microtubos e homogeneizado com 2 mL de acetona 80% (v:v) em um disruptor celular (Roche, MagNA Lyser) com aproximadamente 5 esferas de vidro de 2 mm de diâmetro, a 6000 rpm por 30 segundos. A extração de pigmentos cloroplastídicos foi realizada de acordo com metodologia de Porra *et al.* (1989). Todo o procedimento foi realizado em ambiente escuro.

Determinou-se então a absorvância das amostras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 663 nm, 647 nm e 470 nm (Figura 9). As concentrações de clorofilas (a e b) e carotenoides (em mg L^{-1}) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Lichthenthaler (1987), conforme as seguintes fórmulas:

$$\text{Clorofila } a = C_a = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = C_b = 21,50 A_{647} - 5,10 A_{663}$$

$$\text{Clorofilas totais} = C_{(a+b)} = 7,15 A_{663} + 18,71 A_{647}$$

$$\text{Carotenoides (xantofilas + carotenos)} = (1000 A_{470} - 1,82 C_a - 85,02 C_b) / 198$$

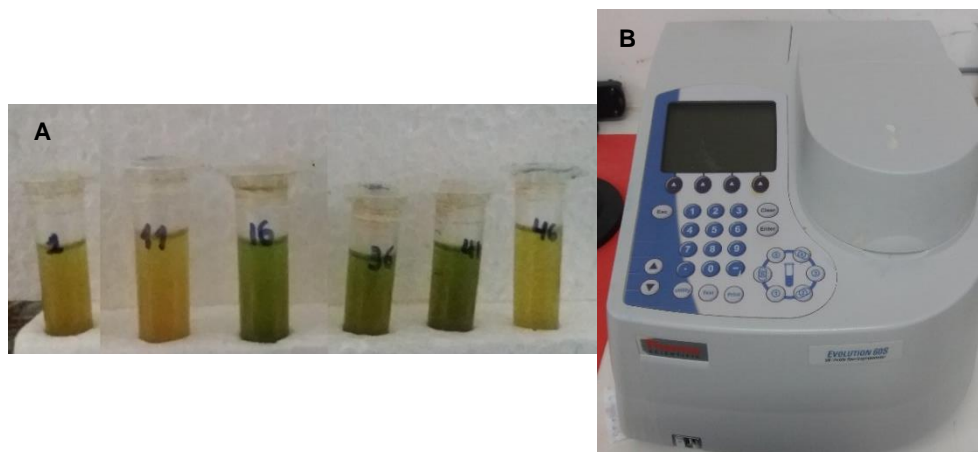


Figura 9: Amostras para determinação de pigmentos cloroplásticos em genótipos de *C. canephora* (A) lidas em espectrofotômetro (B) nos comprimentos de onda 470 nm, 647 nm e 663 nm.

4.8.2.2 fenóis solúveis totais

Aproximadamente 10 mg do macerado foi acondicionado em microtubos de 2 mL, seguidamente realizou-se extrações etanolicas. Na primeira extração, aos microtubos contendo 10 mg de amostra foi adicionado 500 μ L de etanol puro (100%), e aquecidos a 80°C por 20 minutos, posteriormente centrifugados por 5 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante resultando foi recolhido em outro microtubo de 2 mL (S1). No *pellet* restante realizou-se a segunda extração, acrescentando-se então a este 500 μ L de etanol 80%, sendo novamente aquecidos a 80°C por 20 minutos, centrifugados por 5 minutos a 14000 rpm, e o sobrenadante recolhido no eppendorf S1 (S1+S2). Ao *pellet* restante foi então realizado a última extração, adicionando 500 μ L de etanol 50%, aquecidos a 80°C por 20 minutos, centrifugados por 5 minutos a 14000 rpm, sendo o sobrenadante também recolhido no microtubo S1+S2 (S1+S2+S3). O sobrenadante resultante das três extrações (S1+S2+S3) foi armazenado em freezer a -20°C para determinação de FST.

A determinação de FST deu-se através da confecção de curva padrão, utilizando ácido tânico como padrão. Em microtubos de 2 mL foi acrescido 20 μ L de extrato (sobrenadante), 180 μ L de etanol 80%, 1000 μ L de Folin-Ciocalteu e

800 μ L de carbonato de sódio, tendo volume final de 2000 μ L. As amostras foram então mantidas no escuro por cerca de 30 minutos, e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro à 760 nm (Figura 10). A determinação de FST foi realizada de acordo com metodologia proposta por Waterhouse (2002).

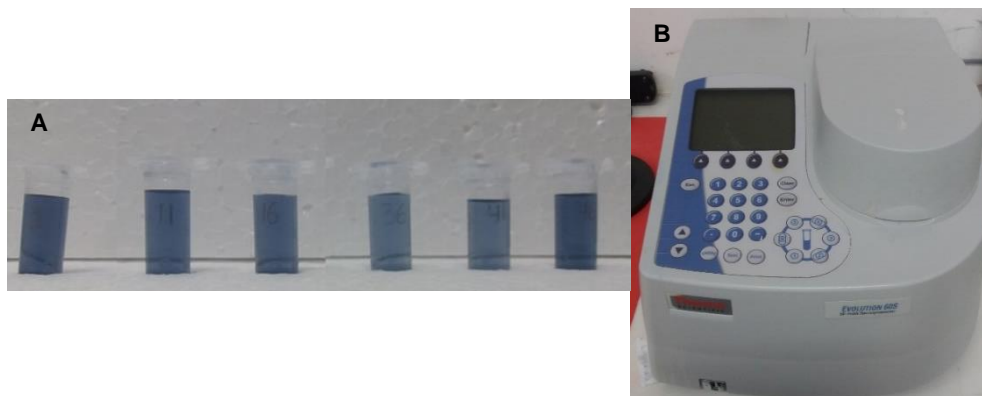


Figura 10: Amostras para determinação de fenóis solúveis totais (FST) em genótipos de *C. canephora* (A) lidas em espectrofotômetro (B) em comprimento de onda de 760 nm.

4.8.2.3 Nitrogênio e fósforo

Para as avaliações da concentração de N e P foram selecionadas quatro folhas de cada indivíduo de cada um dos seis genótipos, totalmente expandidas, do terço médio, da terceira ou quarta roseta (contadas a partir do ápice) de ramos plagiotrópicos do cafeeiro, armazenadas previamente para transporte em sacos de papel e levados até o Laboratório de Botânica do CCENS onde foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 60°C. Após 72 h, e a cada 24 h, os discos foram pesados em balança de precisão analítica até atingir massa constante. Em seguida, o material vegetal foi macerado em moinho de facas tipo willey (Figura 11), armazenado em sacolas de plástico transparente e encaminhadas para análise de nitrogênio (N) e fósforo (P) na empresa Fullin - Laboratório de Análise Agronômica e Ambiental LTDA, localizado no município de Linhares-ES. Para determinação de N foi utilizada a técnica de digestão ácida a quente, e para determinação da concentração de P utilizou-se a metodologia de digestão nitro-perclórica.



Figura 11: Trituração das amostras em moinho de facas tipo willey, para a determinação da concentração de N e P.

4.9 Análises estatísticas

Para as análises dos dados utilizaram-se as médias de cada um dos genótipos, resultando nos seis pontos apresentados nos gráficos de regressão ($n=6$). Os dados obtidos através da análises destrutivas e não destrutivas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e testes de comparação de médias (Scott-Knot $P<0,05$) através do *software* Programa Rbio (BHERING, 2017). As variáveis foram então submetidas a análises de regressões lineares de primeiro e segundo grau, utilizando o Programa R. As regressões obtidas foram classificadas de acordo com p valor (<0.05) pelo teste F de médias e o coeficiente de determinação (R^2).

5. RESULTADOS

Experimento 1

Foi detectada divergência genética entre os genótipos de *C. canephora* para todas as características morfofisiológicas avaliadas (AFU, ICTD, IFLA, IANT, IBN) exceto para AFE. As características que mais contribuíram para a divergência entre os genótipos avaliados foram ICTD, seguidos por AFU e IBN, de acordo com a contribuição relativa de caracteres de Singh (Tabela 3).

Tabela 3. Contribuição relativa dos caracteres - área foliar unitária (AFU), área foliar específica (AFE), índice de clorofila total (ICTD), índice de flavonoides (IFLA), índice de antocianinas (IANT) e índice de balanço de nitrogênio (IBN) - para diversidade de Singh (1981), determinados através da Distância Generalizada de Mahalanobis em genótipos de *C. canephora*.

Caracteres avaliados	Valores %
AFU	23.62
AFE	6.71
ICTD	28.49
IFLA	15.90
IANT	6.88
IBN	18.40

As distâncias genéticas entre os genótipos, de acordo com a matriz de distâncias originais de Mahalanobis, variaram entre 0.50 (entre os genótipos 20 e 35) a 90.35 (entre os genótipos 9 e 32). Os genótipos 9 e 32 foram portanto, os envolvidos nas maiores distâncias genéticas.

Como pode ser observado no Dendrograma de dissimilaridade genética, a partir do ponto de corte significativo a aproximadamente 60% de dissimilaridade, houve a formação de quatro grupos distintos (Figura 12). O grupo I foi constituído por 16 genótipos (7, 22, 20, 35, 29, 8, 28, 39, 14, 4, 34, 2, 11, 23, 32 e 5), sendo o grupo com o segundo maior número de genótipos, correspondendo a 40% do total avaliado; o grupo II formado por 21 genótipos (30, 36, 3, 6, 16, 9, 26, 31, 40, 18, 38, 15, 17, 37, 13, 19, 27, 12, 25, 33 e 24), responsável por compreender mais da metade dos genótipos, correspondendo a 52,5% do total de material avaliado; o grupo III composto por dois genótipos (2 e 10), respondendo a 5% do total dos genótipos; e o último grupo formado apenas pelo genótipo 21, que responde a 2,5% do total de material de estudo.

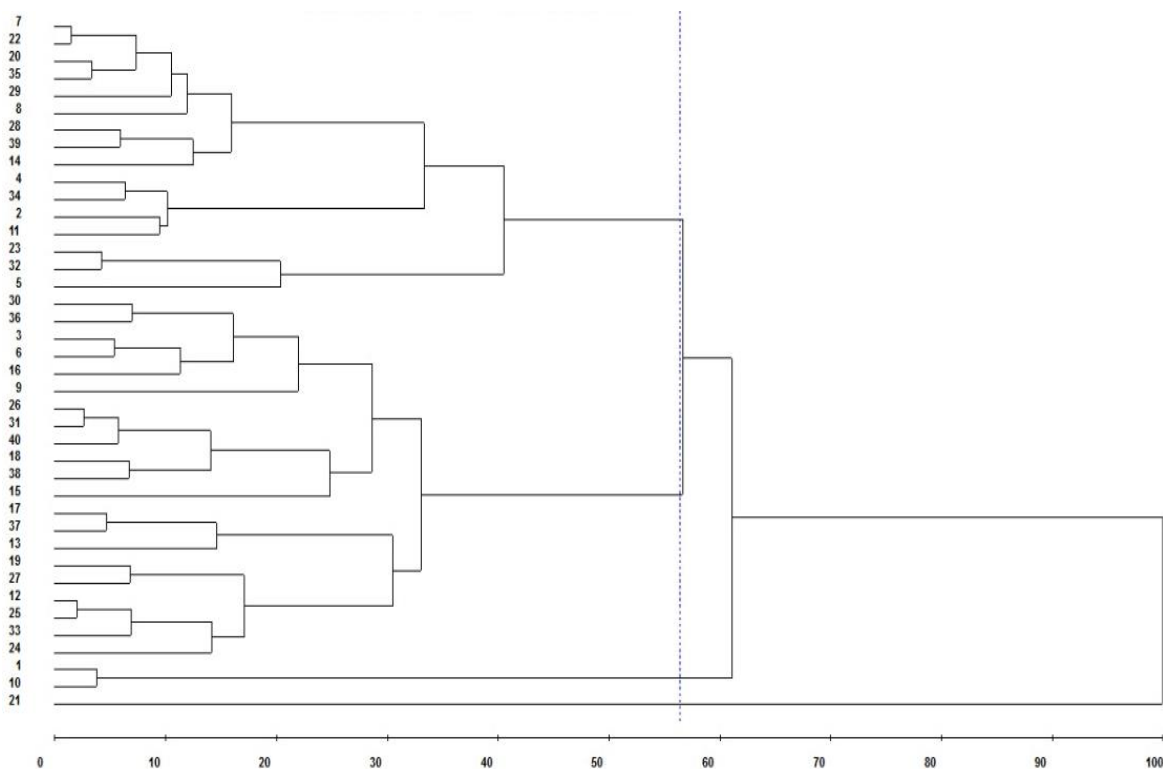


Figura 12: Dendrograma representativo da divergência genética entre 40 genótipos de *C. canephora* obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando a distância generalizada de Mahalanobis e ponto de corte significativo a aproximadamente 60%.

De todas as características avaliadas, apenas AFE não apresentou diferença significativa entre os grupos. O ICTD e IBN apresentam o mesmo padrão de formação de grupos, sendo que os grupos com maiores ICTD (IV e II) também obtiveram IBN elevados. Os grupos I e III caracterizam-se por apresentarem os menores ICTD e IBN. O grupo I apresenta a segunda maior AFU e IANT que os demais, já o grupo III apresenta menor AFU e o maior IANT que os demais. Os grupos II e IV caracterizam-se por apresentarem os dois maiores ICTD e IBN e menores IANT. O grupo IV no entanto exibiu maior AFU que todos os demais. Com exceção do grupo IV, todos os outros obtiveram IFLA superiores (Tabela 4).

Tabela 4. Caracteres morfofisiológicos - área foliar unitária (AFU), área foliar específica (AFE), índice de clorofila total (ICTD), índice de flavonoides (IFLA), índice de antocianinas (IANT) e índice de balanço de nitrogênio (IBN) – avaliados em genótipos de *C. canephora*. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos formados (Teste de Scott-knot $P < 0.05$).

Grupos	AFU (cm ²)	AFE (kg ¹ m ⁻²)	ICTD	IFLA	IANT	IBN
I	77.421 b	0.218	30.912 c	1.476 a	0.116 b	22.012 c
II	63.637 c	0.233	37.990 b	1.418 a	0.097 c	28.001 b
III	57.899 c	0.228	29.516 c	1.450 a	0.156 a	21.137 c
IV	101.119 a	0.222	41.252 a	1.092 b	0.095 c	40.031 a

Experimento 2

5.1 Índices de pigmentos determinados com clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG e Dualex) e caracteres bioquímicos e morfofisiológicos em genótipos de *C. canephora*.

Constataram-se diferenças estatísticas significativas entre os genótipos para todos os índices fotossintéticos estimados com os clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG; Dualex). Conforme pode ser observado na Tabela 5, há relação análoga entre os índices de clorofilas e o IBN, sendo os genótipos que apresentaram maiores índices de clorofila (genótipos 18, 9 e 21) também obtiveram maiores IBN. Observa-se também relação inversa entre o IBN e os índices de flavonoides e antocianinas, sendo que genótipos que apresentaram maiores IBN apresentaram IFLA e IANT inferiores.

Tabela 5: Índices de pigmentos avaliados com a utilização de clorofilômetros portáteis (ClorofiLog e Dualex) em genótipos de *Coffea canephora*. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Caracteres	Genótipos					
	18	9	21	5	2	34
Índice de clorofila a (ICa)	44.015 a	42.878 a	43.328 a	40.920 b	39.238 b	38.843 b
Índice de clorofila b (ICb)	21.968 a	22.095 a	18.580 b	14.113 c	11.300 d	10.628 d
Índice de clorofila total (ICTC)	65.983 a	64.970 a	61.908 b	55.033 c	50.538 d	49.448 d
Índice de clorofila total Dualex (ICTD)	42.822 a	44.235 a	38.403 b	31.274 c	29.335 c	24.177 d
Índice de flavonoides (IFLA)	1.465 b	1.475 b	1.167 d	1.685 a	1.292 c	1.713 a
Índice de antocianinas (IANT)	0.090 d	0.099 d	0.094 d	0.127 b	0.109 c	0.164 a
Índice de balanço de nitrogênio (IBN)	30.584 b	31.052 b	35.221 a	19.050 d	24.327 c	14.498 e

Houve uma forte correlação ($R= 0,98$ e $P < 0,05$) entre as leituras dos clorofilômetros portáteis ClorofiLOG e Dualex, o que demonstra que ambos os equipamentos apresentam correspondências significativas em suas aferições. O ClorofiLOG, no entanto, apresenta índices de leituras maiores que os determinados pelo Dualex.

Assim como através das análises não destrutivas realizadas com os clorofilômetros portáteis, obteve-se diferenças estatísticas significativas entre os genótipos para os índices de pigmentos fotossintéticos, com exceção dos carotenoides, que não apresentou diferença significativa entre os genótipos (Tabela 6). Conforme pode-se constatar pela análise dos dados, obteve-se também relação análoga entre as concentrações de clorofilas e as concentrações de N, e relação inversa entre estes e a concentração de FST, com exceção de alguns genótipos.

Parâmetros de fluorescência apresentaram relação inversa entre os genótipos, sendo que os genótipos com maior ETR apresentaram menores valores de TRA. Já para as variáveis P e AFE não se obteve diferença estatística significativa entre os genótipos.

Tabela 6: Características avaliadas através de metodologias bioquímicas e morfofisiológicas em genótipos de *C. canephora*. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Caracteres	Genótipos					
	18	9	21	5	2	34
Clorofila a (Cl _a) (kg m ²)	0.342 a	0.264 b	0.261 b	0.194 c	0.199 c	0.181 c
Clorofila b (Cl _b) (kg m ²)	0.133 a	0.104 b	0.108 b	0.072 c	0.083 c	0.063 c
Clorofila total (CT) (kg m ²)	0.428 a	0.318 b	0.318 b	0.217 c	0.235 c	0.196 c
Carotenoides totais (CAR) (kg m ²)	0.034	0.030	0.029	0.032	0.033	0.031
Razão clorofila a/b (Cl _a /Cl _b)	0.198	0.210	0.196	0.226	0.183	0.226
Nitrogênio total (N) (kg m ²)	2.356 a	2.284 a	2.333 a	1.994 b	1.976 b	1.825 b
Fósforo total (P) (kg m ²)	0.126	0.115	0.116	0.120	0.105	0.113
Fenóis solúveis totais (FST) (kg m ²)	8.938 b	10.590 a	8.738 b	8.205 b	10.422 a	12.682 a
Área foliar específica (AFE) (m ² k ⁻¹)	12.999	12.233	12.394	12.804	13.260	12.910
Transmitância (TRA) (%)	1.015 c	0.853 c	1.083 c	2.607 b	2.975 b	4.266 a
Taxa de transporte de elétrons (ETR)	69.491 a	64.817 a	51.049 b	64.733 a	40.703 b	50.257 b

Conforme observa-se acima, as determinações de pigmentos fotossintéticos obtidos por meio da utilização de clorofilômetros portáteis apresentaram correspondências significativas com as extrações realizadas através de análises bioquímicas (Tabelas 5 e 6). De modo geral, genótipos que apresentaram maiores índices de clorofilas, determinados com clorofilômetros portáteis e por meio de metodologias bioquímicas, apresentaram também maiores IBN e concentração de N, além de maiores valores de ETR em detrimento de menores valores de TRA.

No momento das aferições notou-se variação quanto a intensidade do verde foliar presente nas folhas dos genótipos avaliados. Observa-se que os genótipos que apresentaram maiores índices de clorofilas, estimados pelos clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG e Dualex) e também através de análises bioquímicas (Tabelas 5 e 6), exibiam maior intensidade de coloração verde foliar (Figura 13). Desta forma, nota-se a eficácia dos equipamentos em mensurar concentrações de clorofilas através da estimativa do verde foliar em genótipos de *C. canephora*.



Figura 13: Intensidade da coloração verde foliar de genótipos de *C. canephora* ordenados de forma decrescente de acordo com a estimação dos índices de clorofila determinados pelos clorofilômetros portáteis. Fotos ilustrando a divergência na intensidade de coloração verde foliar dos genótipos.

5.2 Relações obtidas através de regressões lineares entre as variáveis não destrutivas e destrutivas em genótipos de *C. canephora*.

Algumas das relações estabelecidas através de regressões lineares apresentaram maior coeficiente de determinação quando representadas em base de área. Já para outras, conforme será representado abaixo, melhores resultados foram obtidos quando os dados foram expressos em base de massa.

Os índices de clorofila total (ICT) obtidos com clorofilômetros portáteis apresentaram modelos de regressão significativos (p valor $\leq 0,05$) pelo teste F de médias, com as concentrações de clorofilas extraídas com a utilização de solventes orgânicos (Figura 14). Observa-se melhores resultados para os índices e concentrações de clorofila total (CT) através de modelos matemáticos expressos em base de área. O ClorofiLOG apresentou maior coeficiente de determinação ($R^2=0,81$) em relação ao Dualex ($R^2=0,76$).

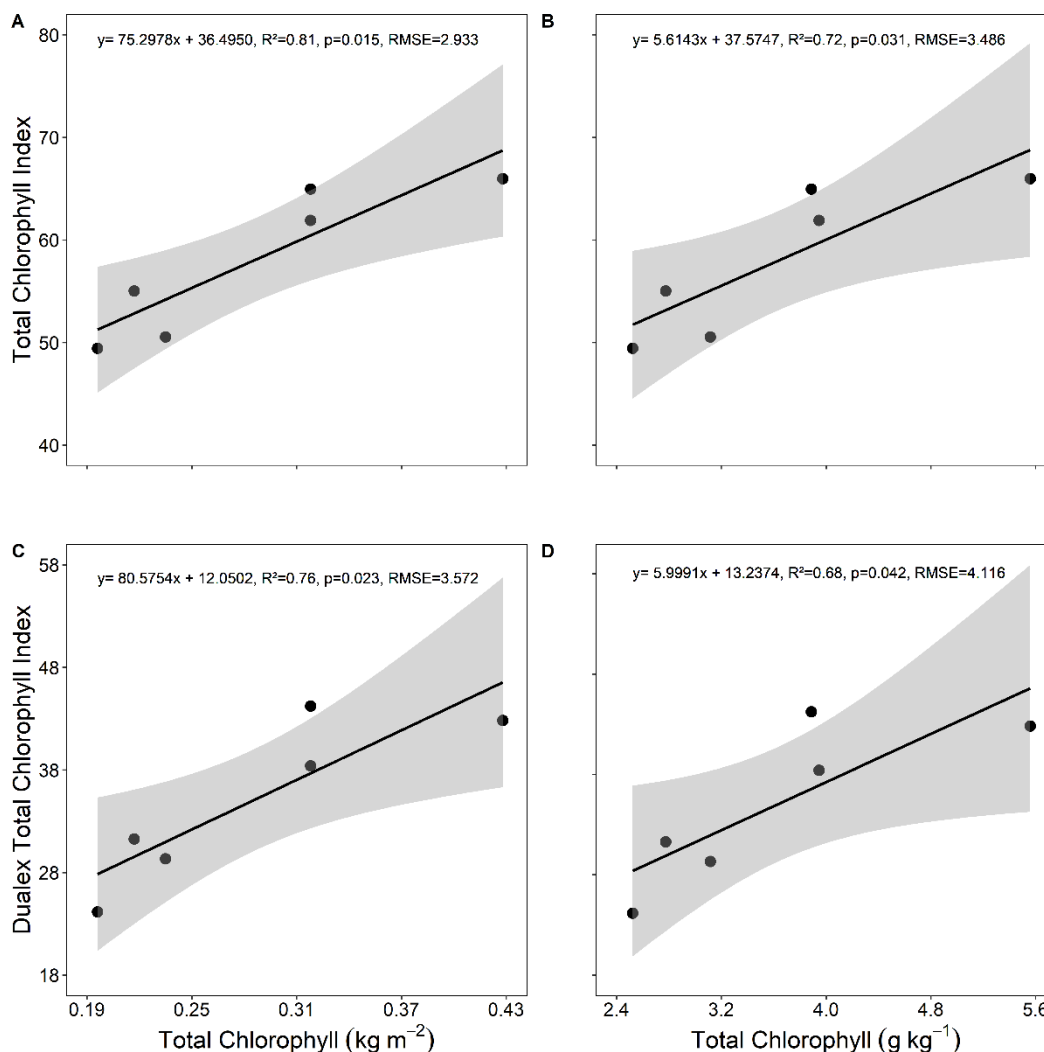


Figura 14: Relação entre os índices de clorofila total obtidos com clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG CFL 1030, Falker; Dualex Scientific, Force-A) e por meio de análises bioquímicas. (A) e (C) clorofila total expressa em base de área; (B) e (D) clorofila total expressa em base de massa. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.

Para avaliar a integridade das relações estabelecidas entre os dados avaliados, além do coeficiente de determinação (R^2) pode ser utilizado a Raiz do Erro Médio Quadrático (RMSE), cujos valores, quanto mais próximos de zero, melhor os dados se ajustam, e maior a confiabilidade dos resultados. Observa-se acima que os valores de RMSE para as relações mostradas estão em torno de três, demonstrando portanto, que as relações estabelecidas entre os dados dos clorofilômetros portáteis e as análises bioquímicas são significativas.

Obteve-se relação significativa entre os índices de clorofila “a” (ICa) e “b” (ICb) obtidos por meio da utilização dos clorofilômetros portáteis e metodologias

bioquímicas (Figura 15), dados também melhor expressos em base de área. Valores de coeficiente de determinação e RMSE significativos para as relações estabelecidas (ICa, $R^2=0.81$, $RMSE=0.8709$; ICb, $R^2=0.78$, $RMSE=2.2294$), com p valor < 0.05 pelo teste F de médias.

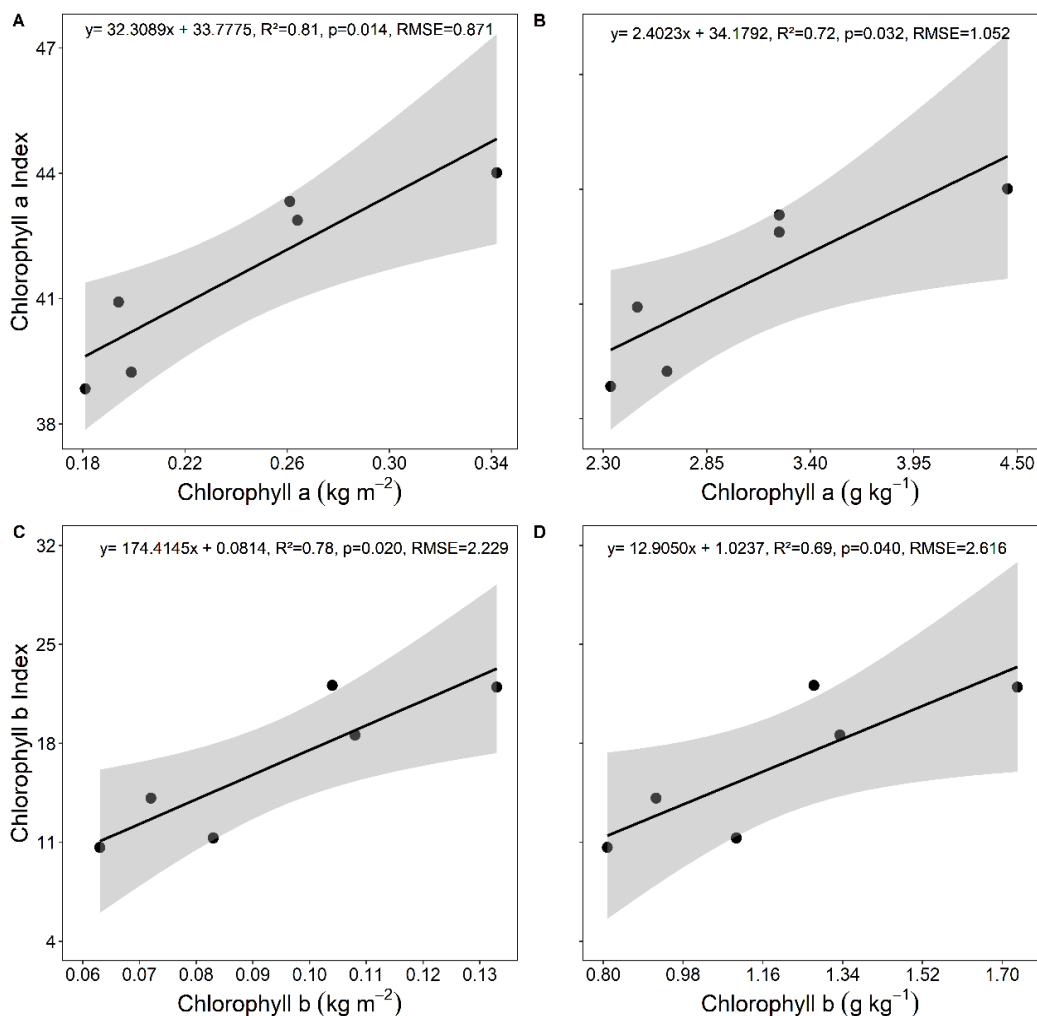


Figura 15: Relação clorofila “a” e “b” determinadas com clorofilômetro portátil ClorofiLOG e análises bioquímicas em genótipos de *C. canephora*. (A) e (B) índice de clorofila “a” e concentração de clorofila “a” expresso em base de área e massa, respectivamente; (C) e (D) índice de clorofila “b” e concentração de clorofila “b” expresso em base de área e massa, respectivamente. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.

Índices obtidos com a utilização do clorofilômetro portátil Dualex Scientific (índice de clorofila total (ICTD), índice de flavonoides (IFLA) e índice de antocianinas (IANT)) quando comparados com as concentrações de Cl_a e Cl_b obtidos por meio de metodologias bioquímicas foram melhor ajustados por meio de modelos matemáticos lineares, exceto para os IFLA, onde um modelo matemático

quadrático melhor se ajustou as relações (Figuras 16 e 17), obtendo-se valores de coeficientes de determinação maiores quando os dados foram expressos em base de área, exceto pelos IFLA, onde em base de massa apresentaram maior coeficiente de determinação, apresentando valores de RMSE dentro do padrão estabelecido. Observa-se que os ICTD apresentaram relação linear positiva com as determinações de Cla e Clb, enquanto que os demais demonstraram relação inversa.

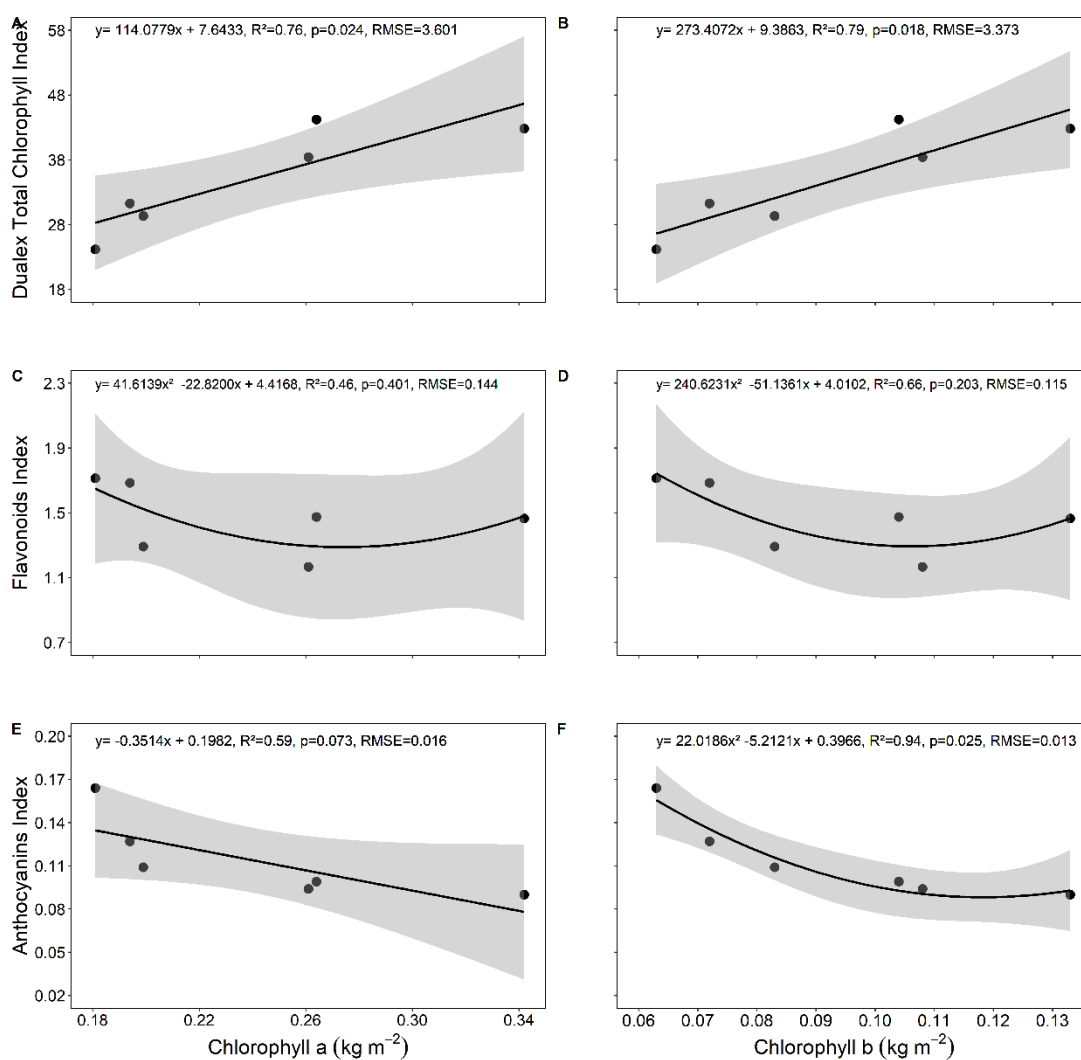


Figura 16: Relação, expressa em base de área, entre análises de regressões obtidas com os índices determinados por meio da utilização do clorofilômetro portátil Dualex e as concentrações de clorofila “a” e “b” obtidos por metodologias bioquímicas em genótipos de *C. canephora*. (A), (C) e (E), relação Dualex/Cl a; (B), (D) e (F), relação Dualex/Cl b. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.

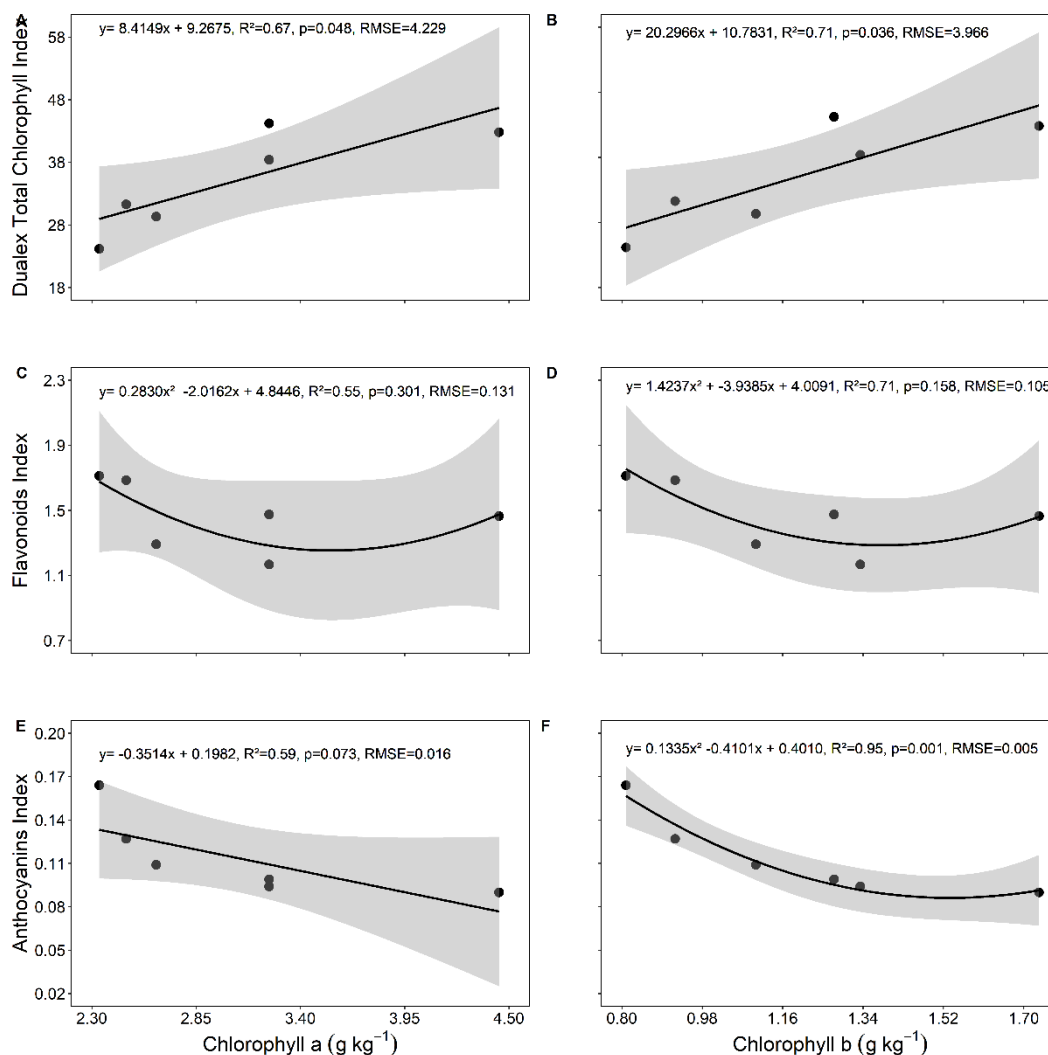


Figura 17: Relação, expressa em base de massa, entre análises de regressões obtidas com os índices determinados com a utilização do Dualex e as concentrações de clorofila “a” e “b” obtidos por metodologias bioquímicas em genótipos de *C. canephora*. (A), (C) e (E), relação Dualex /Cl a; (B), (D) e (F), relação Dualex /Cl b. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.

Fortes correlações também foram observadas entre os índices de clorofila (ICTC, ICa, ICb, ICTD) e IANT determinados por meio de clorofilômetros, com as determinações bioquímicas de N, com coeficientes de determinação superiores a 0.8 (Figuras 18 e 19), sendo a relação estabelecida IANT/N melhor ajustada em base de massa, e por um modelo matemático quadrático. Valores de RMSE inferiores a 3, exceto para a relação ICTD/N expresso em base de massa, onde obteve-se $RMSE = 3.306$. A medida em que aumenta-se os índices de clorofilas determinados com os clorofilômetros portáteis, observa-se acréscimos também nas concentrações de N. Observando relação inversa entre os IFLA e IANT

determinados com o Dualex Scientific e as determinações bioquímicas da concentração de N.

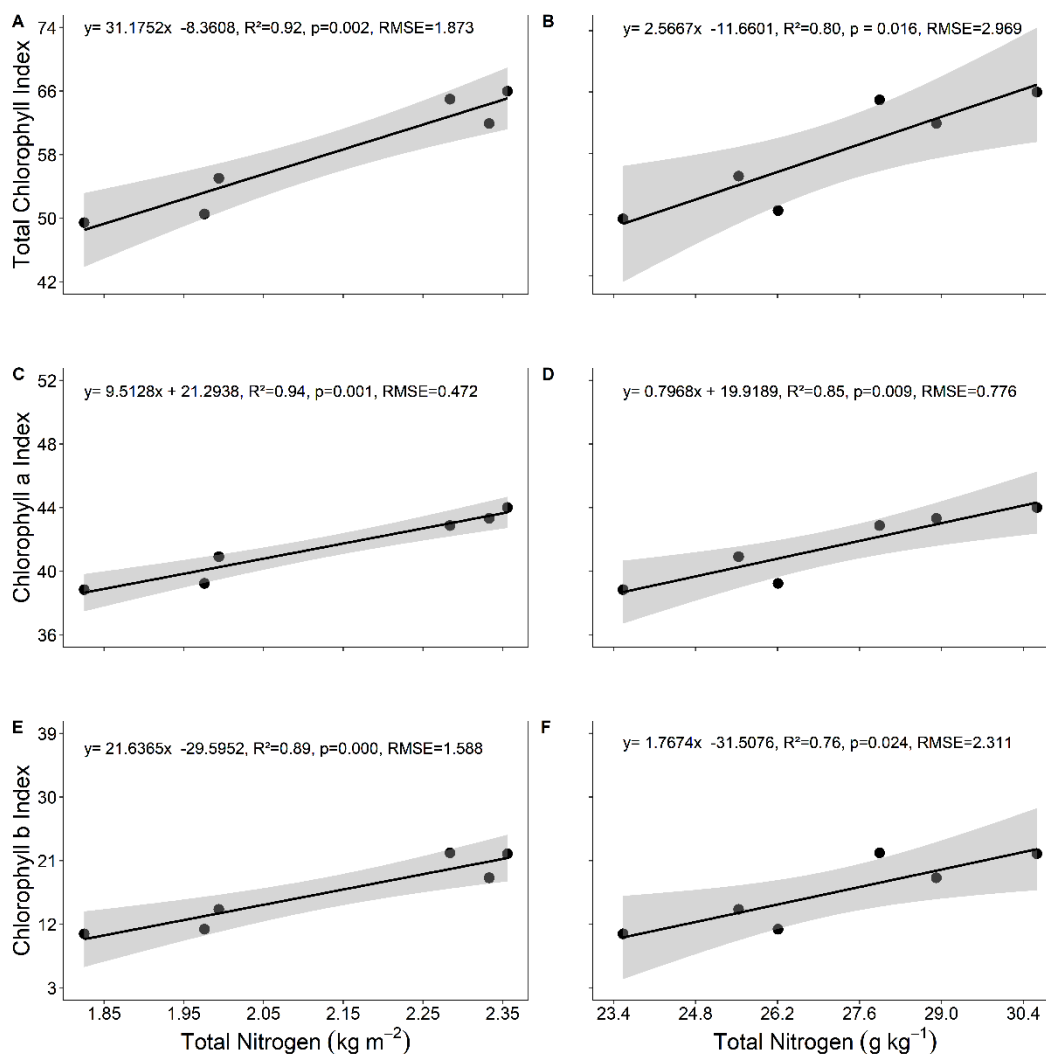


Figura 18: Relação entre os índices de clorofila determinados com o ClorofiLOG e a concentração de nitrogênio total determinado por metodologias bioquímicas em genótipos de *C. canephora*. (A), (C) e (E), resultados expressos em base de área; (B), (D) e (F), resultados expressos em base de massa. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.

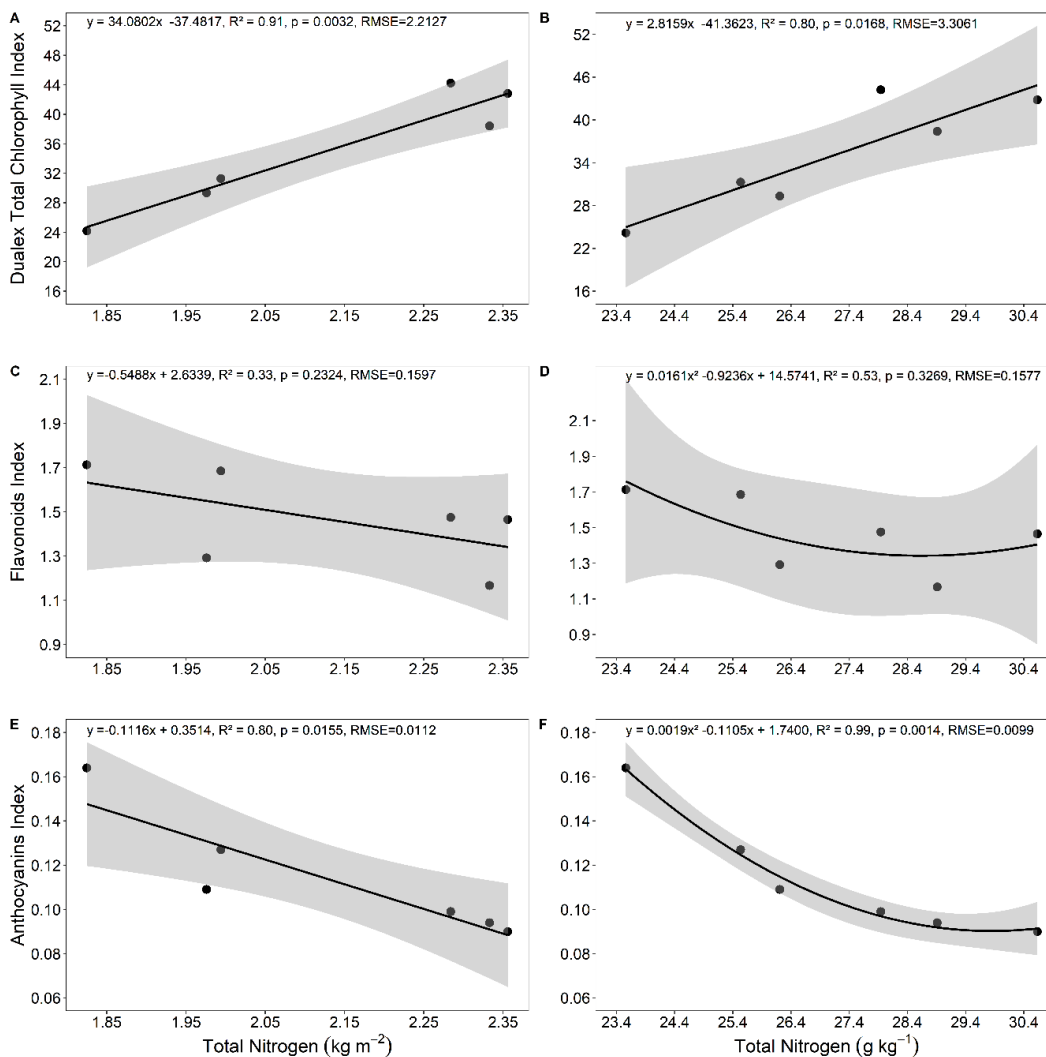


Figura 19: Relação entre os índices determinados com o Dualex e a concentração de nitrogênio total determinadas por meio de análises bioquímicas em genótipos de *C. canephora*. (A), (C) e (E), resultados expressos em base de área; (B), (D) e (F), resultados expressos em base de massa. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.

As relações estabelecidas entre o IBN determinado com o clorofilômetro portátil Dualex com as concentrações de N determinados por análises bioquímicas apresentaram forte relação linear positiva (Figura 20), com coeficiente de determinação superior a 0,8, e melhor ajuste expresso em base de área, com RMSE inferior a 3

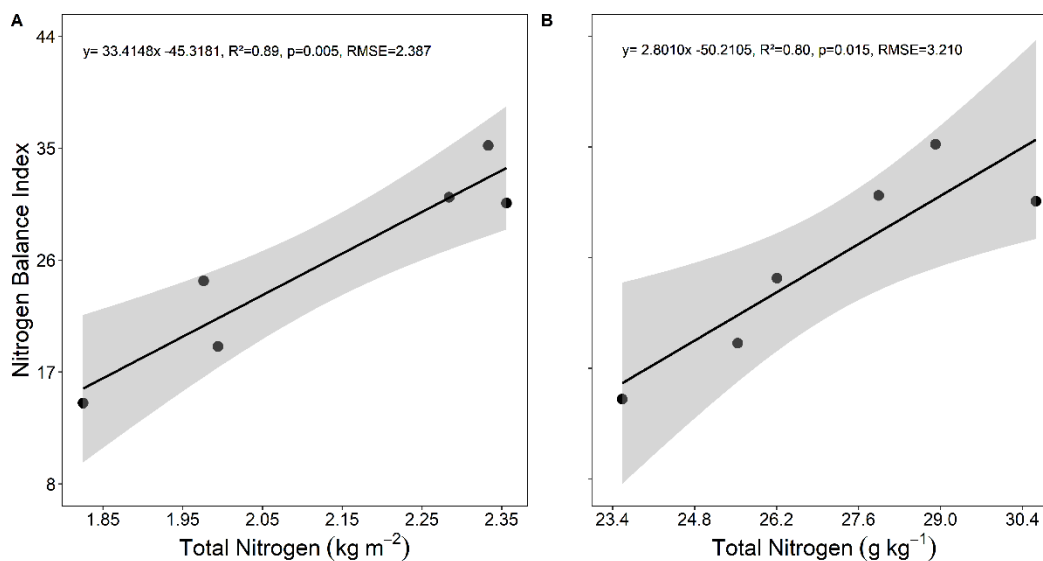


Figura 20: Relação entre o índice de balanço de nitrogênio (IBN) estimado com o Dualex e a concentração de nitrogênio total determinado por meio de análises bioquímicas em genótipos de *C. canephora*. (A) resultados expressos em base de área; (B), resultados expressos em base de massa. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.

Por fim, os parâmetros de fluorescência (Taxa de transporte de elétrons - ETR, e transmitância foliar - TRA) determinados com o analisador de gases a infravermelho (IRGA) apresentaram relações significativas apenas para os ajustes feitos com os índices dos clorofilômetros e TRA, com coeficientes de determinação superiores a 0.84 e RMSE inferiores a 3 (Figura 21). A medida em que ocorre aumentos nos índices de clorofila (ICTC, ICa, ICb, ICTD) e IBN, observa-se decréscimos nos valores de TRA. O contrário é observado para os IFLA e IANT, onde valores inferiores de IFLA e IANT estão relacionados a aumentos em TRA.

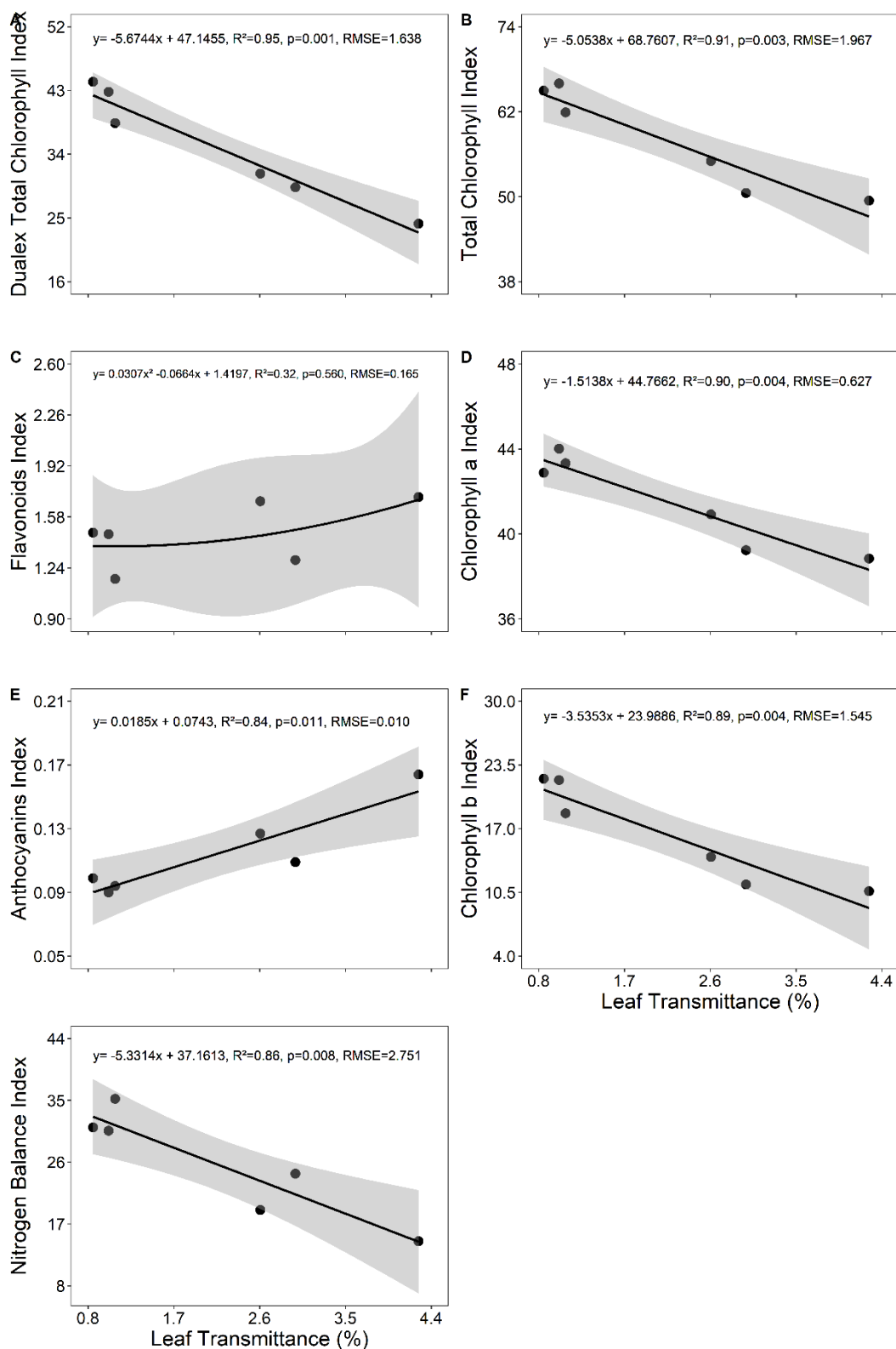


Figura 21: Relação entre os índices estimados pelos clorofilômetros portáteis e os parâmetros de transmitância foliar determinados com o IRGA em genótipos de *Coffea canephora*. (A), (C), (E) e (G), índices estimados com o Dualex; (B), (D) e (F), índices estimados com o ClorofiLOG. A faixa cinza representa o intervalo de confiança.

Apenas algumas relações de regressões estabelecidas entre os índices determinados com o Dualex e as concentrações bioquímicas de CAR e FST foram significativas (Tabela 7). As demais relações estabelecidas para carotenoides totais (CAR), taxa de transporte de elétrons (ETR), fósforo (P) e fenois solúveis totais (FST) não foram significativas, sendo as equações de determinação representadas na Tabela 8 em anexo.

Tabela 7: Equações de calibração significativas para os índices (IBN e IANT) determinados com o clorofilômetro portátil Dualex e as concentrações bioquímicas de CAR e FST. As equações convertem os índices determinados com o Dualex em concentrações de CAR e FST. Equações de calibração expressas em base de massa e área.

Método	Expresso	y	x	R ²	p valor	RMSE	Equação de calibração
Dualex	Área	IBN	CAR	0.80	0.086	2.712	$2489642.9x^2 - 157956.4x + 2523.8$
	Massa	IANT		0.79	0.095	0.016	$30.9905x^2 + 25.0229x - 4.9049$
		IBN		0.87	0.045	2.712	$8668.1x^2 - 7062.7x + 1455.3$
	Área	IANT	FST	0.88	0.041	0.019	$0.0083x^2 - 0.1638x + 0.8945$
	Massa	IBN		0.87	0.045	0.018	$4.559e^{-05}x^2 - 1.134e^{-02} + 8.000e^{-01}$

6. DISCUSSÃO

Em *C. canephora* constatou-se divergência genética quanto à intensidade da coloração verde foliar entre os genótipos, sendo comprovada pela diferença significativa entre os índices de clorofila total, característica que mais contribuiu para a variação entre os grupos. Uma planta com maiores concentrações de clorofilas podem apresentar taxas fotossintéticas mais elevadas (CASTRO *et al.*, 2014). As clorofilas são os pigmentos responsáveis pela captura de radiação luminosa e a conversão (através do processo fotossintético) em energia química, sob a forma de ATP e NADPH. Por essa razão, estes pigmentos estão estreitamente relacionados com a eficiência fotossintética das plantas (TAIZ *et al.*, 2017).

Ademais, a área foliar também é um indicador da capacidade fotossintética. Folhas mais espessas (maior AFE) apresentam maior densidade de clorofilas e proteínas por unidade de área foliar e apresentam maior capacidade fotossintética do que folhas mais finas (RUTTANAPRASERT *et al.*, 2016). E folhas em menor tamanho (menor AFU) configura menor área foliar transpirante, menos suscetível ao aquecimento e às elevadas perdas de água por transpiração (FINI *et al.*, 2010), sendo portanto mais eficientes no uso da água.

A produtividade das culturas por unidade de água transpirada tornou-se alvo dos programas de melhoramento genético visando desenvolvimento de variedades eficientes no uso da água. Para tal, características como T, TE e IC são indicadas para seleção de genótipos promissores, sendo a produtividade relacionada a estas três características (PASSIOURA, 1977). Dentre as características fisiológicas, a ET (matéria seca produzida por unidade de água transpirada) é um parâmetro diretamente relacionado à produtividade, contudo é difícil de ser estimado. No entanto, estudos indicam que AFE e índices de clorofila estão diretamente relacionados com a matéria seca produzida por unidade de água transpirada (NIGAM; ARUNA, 2008).

Em *C. canephora* ICTD e AFU foram os que mais contribuíram para a divergência genética entre os genótipos. O grupo II foi o que apresentou maiores ICTD, maior AFE (unidade de área foliar produzida por unidade de massa foliar) e AFU (densidade foliar), sendo tais características diretamente relacionadas com o rendimento de culturas (LONG; ORT, 2010). Desta forma, o grupo II é portanto

indicado para seleção de genótipos com potencial para estudos de melhoramento genético, visando, por exemplo, a tolerância a seca, principal responsável pela queda na produtividade do cafeeiro (DAMATTA 2004).

Em pesquisas realizadas com amendoim, Nageswara Rao *et al.* (2001) e Upadhyaya (2005) relataram correlação negativa significativa entre os índices de clorofila determinados com SPAD e a AFE, sugerindo a utilização do clorofilômetro para determinar de forma rápida e confiável genótipos com menor AFE. Contudo, Bindu Madhava *et al.* (2003) indicam genótipos com eficiência fotossintética superior os indivíduos com maiores índices de clorofila e maior AFE, independentemente do ambiente.

No geral, grupos com maiores ICTD apresentaram maior IBN, concomitantemente IFLA menores. Esta relação da clorofila com nitrogênio é esperada, uma vez que grande concentração do nitrogênio está alocado em folhas, e grande parte deste nitrogênio é constituinte das moléculas de clorofila (PETERSON *et al.*, 1993), compondo também proteínas fotossintéticas, como RubisCO. Trabalhando com batateira, Coelho *et al.* (2012) observaram que, aumentando doses de nitrogênio na cultura havia decréscimos significativos do índice de flavonoides e teor de fenóis totais, sendo este um bom indicador para avaliar o estado nutricional de nitrogênio na cultura por meio da utilização do clorofilômetro portátil Dualex. Como IBN é uma variável dependente de ICTD/IFLA (GOULAS *et al.*, 2004), espera-se relação inversa entre IBN e IFLA, uma vez que aumentando índices de clorofila automaticamente haverá decréscimos nos índices de flavonoides, e o contrário também é verdadeiro. Maior concentração de fenóis no tecido vegetal pode contribuir para proteção contra excesso de energia e danos associados a radiação, visto que são compostos de defesa celular contra danos fotooxidativos (GILL; TUTEJA, 2010; WILHELM; SELMAR, 2011).

A utilização de índices determinados por clorofilômetros portáteis já foram aplicadas para diversas culturas e espécies vegetais. Jesus e Marrenco (2008) trabalhando com espécies frutíferas visando determinar teor de clorofila por meio do clorofilômetro portátil SPAD-502; Huan *et al.* (2010) investigando a quantidade adequada de cobertura com nitrogênio e o estado nutricional de nitrogênio no milho sob tratamentos com diferentes taxas de aplicação de nitrogênio, avaliados de acordo com as leituras dos clorofilômetros SPAD e Dualex; Conforto (2014),

trabalhando com seringueira visando estimar clorofila mediante a utilização do clorofilômetro portátil ClorofiLOG; além de café conilon (NETTO *et al.*, 2005), objetivando relacionar os pigmentos fotossintéticos extraídos por meio de metodologias bioquímicas, o teor total de nitrogênio e as variáveis de fluorescência da clorofila *a* com as leituras do clorofilômetro portátil SPAD. Com os dados obtidos no presente estudo, a utilização de clorofilômetros portáteis (neste caso o Dualex) se mostra ferramenta promissora também para inferir sobre a divergência genética entre genótipos de *C. canephora* de forma mais rápida e não destrutiva. Esta constatação faz-se importante para a seleção de genótipos com desempenho fotossintético superior, uma vez que concentrações de N foliar podem influenciar na concentração de clorofila (MOSS, 1984). E mediante a utilização do clorofilômetro portátil Dualex, ambos os parâmetros podem ser estimados, por meio de metodologias não destrutivas, de obtenção rápida de resultados, e com equipamento de baixo custo, podendo contribuir também para o processo de fenotipagem.

Mediante os resultados obtidos, constata-se divergência genética quanto a intensidade da coloração verde foliar, podendo-se indicar como genótipos mais promissores para programas de melhoramento genético visando a tolerância a seca, os indivíduos pertencentes ao grupo II, visto as características apresentadas por estes (maior ICTD, maior AFE e menor AFU).

Constata-se que a intensidade do verde foliar é ferramenta útil para estudos de divergência genética, visto que a partir de caracteres morfofisiológicos foi possível a identificação de genótipos de *C. canephora* mais divergentes entre si. Dentre esses caracteres, os ICTD determinados com auxílio do clorofilômetro portátil Dualex, sendo o que mais contribuiu para a divergência genética entre os genótipos estudados.

A concentração de clorofila foliar reflete diretamente nos valores determinados pelos clorofilômetros portáteis. Quanto maior a relação da concentração de clorofilas presente nas folhas, maiores serão os valores estimados pelos clorofilômetros, pois é através da concentração de pigmentos que serão correlacionados os parâmetros estimados (CONCEIÇÃO *et al.*, 2019). Observa-se que ambos os aparelhos utilizados (ClorofiLOG e Dualex) apresentam correlações significativas nas leituras, sendo que o uso de um ou outro dependerá da

necessidade do pesquisador, pois o primeiro mensura apenas índices de clorofila (clorofila “a”, “b” e total) já o segundo estima índices de clorofila total, flavonoides, antocianinas e balanço de nitrogênio.

Desta forma, estimar concentrações de clorofila no tecido foliar fornece informações sobre o estado fisiológico do vegetal. Visto isso, mediante as relações estabelecidas entre os clorofilômetros portáteis e as análises bioquímicas, pode-se indicar a utilização de tais equipamentos para determinar concentrações de clorofilas em *C. canephora* de forma rápida e não destrutiva. Além do mais, relações significativas também foram estabelecidas entre os dados dos clorofilômetros e as concentrações de N e TRA que estão intimamente relacionados com o desempenho fotossintético das plantas.

Por serem ferramentas de análises rápidas, permitem avaliar um número maior de amostras em um menor intervalo de tempo (MIELKE *et al.*, 2012), podendo ser ferramentas úteis no processo de fenotipagem em larga escala.

Trabalhando com café conilon, Netto *et al.* (2005), utilizando o clorofilômetro SPAD, para estimar índices de clorofila e nitrogênio em *C. canephora*, obtiveram relações significativas para pigmentos fotossintéticos utilizando modelos matemáticos quadráticos. No entanto, no presente estudo, obteve-se relações com coeficiente de determinação significativo em modelos lineares para determinação de ICTC e ICTD com as determinações bioquímicas de CT. Desta forma recomenda-se a utilização das equações de calibração estabelecidas para cada espécie e para cada equipamento utilizado, visto que podem exibir resultados diferentes.

Para se determinar as concentrações de *Cl_a* e *Cl_b*, indica-se as equações de calibração expressas em base de área para o ClorofiLOG. Para o Dualex recomenda-se, para determinar *Cl_a* a utilização do ICTD, e para determinar *Cl_b* utilizar o IANT, ambos em base de área. Considerando os modelos de regressões estabelecidos, tais relações apresentam maiores coeficiente de determinação e RMSE menores, apresentando maior confiabilidade aos resultados.

Os teores de clorofila nas folhas estão associadas com a capacidade de absorção e transferência de energia para os processos fotoquímicos das plantas, sendo suas concentrações correlacionados positivamente com a proporção de nitrogênio. As moléculas de clorofila são componentes dos cloroplastos e ocorrem

na proporção (a/b) aproximadamente 3:1, sendo que plantas expostas ao alto fluxo fotossintético de fótons (PPF) apresentam aproximadamente 3,2–4,0 e plantas crescendo em ambientes com PPF reduzida têm uma razão em torno de 2,5–2,9 (LICHTHETHALER *et al.*, 1981; LICHTHENTHALER; WELLBURN, 1983; TAIZ *et al.*, 2017). No entanto no cafeeiro, atributos de folhas de sombra permanecem inalterados em cafeeiros expostos a pleno sol, como por exemplo a baixa razão Cl_a/Cl_b (FAHL *et al.*, 1994; DAMATTA; MAESTRI, 1997). Isso pode explicar o fato de não ter sido encontrado diferença estatística significativa entre os genótipos com relação a razão Cl_a/Cl_b .

O IBN determinado pelo clorofilômetro portátil Dualex e as concentrações bioquímicas de N relacionaram-se significativamente, com melhores resultados sendo representados em base de área. Isso demonstra a eficiência na utilização do clorofilômetro portátil Dualex para determinar nitrogênio foliar em genótipos de *C. canephora*. Trabalhando com café, Netto *et al.* (2005) não obteve resultados significativos para estimar nitrogênio através da utilização do clorofilômetro portátil SPAD. No entanto, resultados similares aos estabelecidos no presente estudo também foram encontrados por Peng *et al.* (1995) trabalhando com o clorofilômetro SPAD para determinação de nitrogênio foliar em arroz, obtendo também relações melhores com os valores expressos em base de área, visto que desta forma o efeito confundidor da espessura foliar, quando nitrogênio é expresso em base de massa, é eliminado (CHANG; ROBISON, 2003), pois considera para tal a AFE, expressa pela razão AF/MS , que mesmo não apresentando diferença estatística entre os genótipos, no momento das análises pode se constatar pequenas variações em tamanho e espessura foliar. Fato também relatado por Berg e Perkins (2004), avaliando índices de clorofila e nitrogênio através de um medidor portátil de clorofila em folhas de *Acer saccharum* Marsh, bordo de açúcar, árvore nativa das florestas de madeira do Canadá.

Relações significativas foram obtidas entre os índices determinados pelos clorofilômetros portáteis e as concentrações de N foliar, indicando-se para determinar ICa e $ICTD$, utilizando ClorofiLOG e Dualex respectivamente, as equações estabelecidas em base de área. As relações significativas obtidas entre índices de clorofila e as determinações de N deve-se ao fato de que grande parte

do nitrogênio na planta está alocada em folhas, e grande parte do nitrogênio foliar está presente em moléculas de clorofila (PETERSON *et al.*, 1993).

Estimar nitrogênio por meio de metodologias não invasivas é uma ferramenta importante também para auxiliar nos processos de adubação nitrogenada, visto que, de acordo com o observado em nossos resultados, as concentrações de nitrogênio apresentam diferenças estatísticas significativas entre os genótipos avaliados, desta forma, é necessário que se estime a dosagem correta para adubação, visto que o nitrogênio é reconhecido como uma fonte de contaminação por nitrato no solo, e desta forma, adotando manejo adequado da adubação nitrogenada reduz potencialmente os riscos de contaminação (PETERSON *et al.*, 1993), e por lixiviação, contaminando também as águas. Considerando também que tal fertilizante é de custo elevado, e sua deficiência na plantação pode resultar em reduções no rendimento da cultura, e por outro lado a adubação em excesso por este fertilizante pode contribuir para o crescimento da parte vegetativa (folhas verdes) em detrimento da produtividade da cultura.

Uma grande porção de N nas folhas também é utilizado em proteínas fotossintéticas (EVANS, 1989). Folhas expandidas que crescem sob ambiente sem limitação por irradiância ou concentração de N tendem a apresentar maior acúmulo de compostos de carbono e nitrogênio, que permitem taxa máxima de atividade da RubisCO (GODOY *et al.*, 2014), produzindo mais intermediários do Ciclo de Calvin, aumentando a taxa fotossintética, visto que o incremento de proteínas foliares funciona como um reservatório importante de nitrogênio alocado em RubisCO (SIKUKU *et al.*, 2010). Desta forma, por meio de metodologias de rápidas análises, como a utilização de clorofilômetros portáteis, torna-se possível o diagnóstico do estado nutricional da lavoura, permitindo manejo adequado da adubação, evitando adubação em excesso, contaminação do solo e água, além de contribuir também para compreensão sobre o desempenho fotossintético da cultura. Uma vez que as concentrações de N foliar influencia na concentração de clorofilas, ocorrendo reduções na concentração deste nutriente haverá decréscimos nas concentrações de clorofilas, comprometendo o processo fotossintético tal como o crescimento e desenvolvimento vegetal (MOSS, 1984).

Além disso, a disponibilidade de P no tecido vegetal também tem influência no metabolismo fotossintético, como observado por Silva *et al.* (2010), trabalhando

com disponibilidade de P em mudas de cafeeiro, onde constatou que a baixa disponibilidade de P no solo causou menor condutância estomática e comprometeu a assimilação de CO₂. No presente estudo não obtivemos diferenças estatísticas entre os genótipos quanto a concentrações de P, no entanto, os valores obtidos estão em níveis adequados para a cultura (COSTA; BRAGANÇA, 1996).

Para se determinar o desempenho fotossintético de uma planta é necessário que se avalie algumas características, dentre elas parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, que fornecem informações sobre o estado fisiológico do fotossistema II, podendo-se perceber até que ponto a luz está sendo utilizada pelas moléculas de clorofila e até que ponto está causando danos ao fotossistema (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

A fração de luz absorvida por uma folha (α folha) é necessária para determinar alguns parâmetros de fluorescência, como ETR no Fotossistema II. As pesquisas que abordam parâmetros de fluorescência discutem, em sua maioria, a fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m'), coeficiente de extinção fotoquímica (q_p), rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}) e coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ), alguns avaliam ainda a taxa de transporte de elétrons através do fotossistema II, que é um indicativo da taxa geral de fotossíntese, permitindo estimar o desempenho fotossintético de forma rápida (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Vários estudos são realizados para parâmetros de fluorescência em diferentes espécies, incluindo café sob várias condições. Neto *et al.* (2005), em sua pesquisa para determinar se havia correlação entre os pigmentos fotossintéticos extraídos em DMSO, o teor de nitrogênio total, as variáveis de fluorescência da clorofila *a* e as leituras do SPAD sobre as folhas de *C. canephora*, determinando a utilização do SPAD para diagnosticar o desempenho fotossintético, não abordou em sua pesquisa parâmetros de ETR e TRA.

Observou-se no entanto que os parâmetros de TRA e ETR apresentaram relação inversa entre os genótipos avaliados. E de modo geral, genótipos que apresentaram maiores índices e concentrações bioquímicas de clorofila também apresentaram maiores valores de IBN em detrimento de menores valores de TRA,

sendo o contrário observado para IFLA e IANT, onde decréscimos nos índices de flavonoides e antocianinas refletiram em aumento em TRA.

As propriedades de absorvância, transmitância e reflectância estão diretamente relacionadas a concentrações de pigmentos foliares. Quanto maior a concentração de pigmentos maiores serão os valores de absorvância, em detrimento de transmitância e reflectância (GOEL, 1988), visto que tais parâmetros tem influência direta no desempenho fotossintético, e assim sendo, maiores taxas fotossintéticas serão observadas para a cultura.

As equações estabelecidas não foram estatisticamente significativas para ETR. No entanto, observa-se que as relações estabelecidas influenciam diretamente na ETR e conseqüentemente no desempenho fotossintético, visto que se obteve relações altamente significativas com clorofilas, N e TRA, que estão altamente relacionados com a atividade fotossintética, visto também que ETR é uma variável dependente influenciada pela absorvância foliar. Assim sendo, havendo acréscimos em concentrações de clorofila haverá decréscimos nos parâmetros de TRA, refletindo em maiores valores de absorvância foliar, que por sua vez reflete também em aumentos na ETR. Desta forma, constata-se que é possível a determinação de desempenho fotossintético mediante a estimação do verde foliar em genótipos de *C. canephora*.

7. CONCLUSÕES

Há divergência genética na intensidade da coloração verde foliar entre os genótipos de *C. canephora*, constatando-se diferenças significativas nos parâmetros morfofisiológicos utilizados.

Os índices de clorofila total e área foliar unitária apresentaram maior contribuição para a divergência entre os genótipos estudados, possibilitando a seleção de genótipos de *C. canephora* com potencial para estudos fisiológicos complementares.

Indica-se como promissores para estudos em programas de melhoramento genético, visando a tolerância a seca, os genótipos dispostos no grupo II, por apresentarem maiores ICTD, AFE e menor AFU.

O desempenho fotossintético em genótipos de *C. canephora* pode ser determinado mediante a utilização dos clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG CFL 1030; Dualex Scientific). Para tal, recomenda-se a utilização das equações de calibração adequadas para cada característica e para cada equipamento a ser utilizado.

A determinação da concentração de clorofila total pode ser realizada por meio da utilização dos clorofilômetros portáteis, no entanto para estimar clorofila “a” a utilização do ClorofiLOG apresentou relações superiores ao Dualex.

É possível que se determine a concentração de nitrogênio total por meio dos clorofilômetros utilizados nesta pesquisa, assim como transmitância foliar, que podem, em conjunto, contribuir para compreensão da eficiência fotossintética da cultura, pois refletem diretamente no desempenho fotossintético.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERG, A. K. V. D.; PERKINS, T. D. Evaluation of a portable chlorophyll meter to estimate chlorophyll and nitrogen contents in sugar maple (*Acer saccharum Marsh.*) leaves. **Forest Ecology and Management**, v. 200, n. 3, p. 113 – 117, 2004.
- BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE R. J.; MACRAE, R. **Coffee: Agronomy**. London: Elsevier Applied Science, p. 1- 44, 1988.
- BHERING, L. L. **Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform.Crop Breeding and Applied Biotechnology**. Editora UFV. Viçosa, v.17, 3p, 2017.
- BINDU MADHAVA, H.; SHESHSHAYEE, M.; SHANKAR, A. G.; PRASAD, T. G.; UDAYAKUMAR, M. Use of SPAD chlorophyll meter to assess transpiration efficiency of peanut. *In*: CRUICKSHANK, A. W.; RACHAPUTI, N. C.; WRIGHT, G. C.; NIGAM, S. N. (Eds) **Breeding of drought resistant peanuts**. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, p. 3–9, 2003.
- BRINATE, S. V. B. Crescimento, fotossíntese e nutrição de genótipos de *coffea canephora* enxertados em porta-enxertos tolerantes a estresses. **Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2018. 76 p.
- BRINATE, S. V. B.; MARTINS, L. D.; RODRIGUES, W. N.; COLODETTI, T. V.; AMARAL, J. F. T.; TOMAZ, M. A. Accuracy of linear methods to estimate the leaf area of genotypes of conilon coffee. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 30, p. 2955-2960, 2015.
- BRITO, G. G.; SOFIATTI, V.; BRANDÃO, Z. N.; SILVA, V. B.; SILVA, G. G.; SILVA, D. A. Non-destructive analysis of photosynthetic pigments in cotton plants. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 4, p.671-678, 2011.
- CASTRO, F. A.; CAMPOSTRINI, E.; NETTO, A. T.; GOMES, M. M. A.; FERRAZ, T. M.; GLENN, D. M. Portable chlorophyll meter (PCM-502) values are related to total

chlorophyll concentration and photosynthetic capacity in papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 26, n. 4, p.201-210, 2014.

CAVATTE, P. C.; RODRIGUES, W. N.; AMARAL, J. F. T.; PEREIRA, S. M. A.; VENANCIO, L. P. Arborização em café conilon: aspectos microclimáticos, fisiológicos e nutricionais. *In*: TOMAZ, M. A.; AMARAL, J. F. T.; OLIVEIRA, F. L.; COELHO, R. I. (Org). **Tópicos Especiais em Produção Vegetal IV**. Alegre: CCAUFES, p. 421-444, 2013.

CAVATTE, P. C.; COLA, G. O. A; GRANCIERI, N.; PEREIRA, J. P.; MOREIRA, V. F. Fenômica de Parâmetros Fotossintéticos. *In*: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Fenômica: como a fenotipagem de próxima geração está revolucionando o melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, p. 179-198, 2016.

CHANG, S.X., ROBISON, D.S. Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. **Forest Ecology and Management**, v. 181, n. 3, p. 331–338, 2003.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of Coffea. *In*: CLINFORT, M. N.; WILLSON, K. C. **Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Bean and Beverage**. London: Croom Helm, p. 13 – 47,1985.

CHEN, Y.L.; DUNBABIN, V. M.; DIGGLE, A. J.; SIDDIQUE, K. H. M.; RENGEL, Z. Development of a novel semi-hydroponic phenotyping system for studying root architecture. **Functional Plant Biology**, v. 38, n.5, p. 355-363, 2011.

COELHO, F. S.; FONTES, P. C. R.; FINGER, F. L.; CECON, P. R. Avaliação do estado nutricional do nitrogênio em batateira por meio de polifenóis e clorofila na folha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 584-592, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Café**, safra 2019. v. 5, n. 3, p.1-48, 2019.

CONCEIÇÃO, W. B.; MACHADO, C. M. M.; MACEDO, L. A.; FERREIRA, B. O.; FRANÇA, A. C. Crescimento inicial do cafeeiro em um latossolo vermelho amarelo

sob diferentes umidades do solo. **Revista Craibeiras de Agroecologia**, v. 4, n. 1, p.715-720, 2019.

CONFORTO, E. C.; CORNÉLIO, M. L.; ANDREOLI, R. P.; GONÇALVES, E. C. P. Validation of arbitrary units of chlorophyll contents obtained in intact leaves of rubber tree. **Revista Agro@ambiente**, v. 8, n. 2, p.288-292, 2014.

COSTA, A. N. da; BRAGANÇA, S. M. Normas de referências para o uso do DRIS na avaliação do estado nutricional do café conilon. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, Águas de Lindóia. **Anais...** Rio de Janeiro, v.22, p. 103-104, 1996.

CRUICKSHANK, A. W.; WRIGHT, G. C.; RACHAPUTI, N. C.; FOSTER, S. Multi-environment analysis for Queensland sites. In: CRUICKSHANK, A. W.; RACHAPUTI, N. C.; WRIGHT, G. C.; NIGAM, S. N. (Eds) **Breeding of drought resistant peanuts**. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, p. 72–76, 2003.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. Editora UFV. Viçosa, 278p, 2008.

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

DAMATTA, F. M.; MAESTRI, M. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. **Photosynthetica**, v. 34, n. 3, p. 439-446, 1997.

DAMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M. BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p.485-510, 2007a.

DAMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; SALES, E. F.; ARAÚJO, J. B. S. O Café Conilon em Sistemas Agroflorestais. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. (Ed.). **Café conilon**. Vitória, ES: Incaper, p. 374- 389, 2007b.

DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M. F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357-377, 2011.

DUBBERSTEIN, D. Diversidade genética de 43 genótipos de *Coffea canephora*; e implicações do aumento de temperatura e déficit hídrico ao *Coffea spp.* **Tese de doutorado em Genética e Melhoramento**, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2019. 169 p.

EVANS, J. R. Partitioning of Nitrogen Between and Within Leaves Grown under Different Irradiances. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 6, p.533-548, 1989.

FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C.; VEJA, J.; MAGALHÃES, A. C. Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). **Journal of Horticultural Science**, v. 69, n.1, p. 161-169, 1994.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA. **Manual do medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG CFL 1030**, Porto Alegre, 4 p, 2018.

FASSIO, L. H.; SILVA, A. E. S. Importância Econômica e Social do Café Conilon. *In*: FERRÃO, R.G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA. S. M.; FERRÃO, M. A. G.; DEMUNER, L. H. (Ed.). **Café Conilon**. Vitória, ES: Incaper, p.35-49, 2007.

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A.; BRAGANÇA, S. M.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S. Cultivares de café conilon. *In*: FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA. S. M.; FERRÃO, M. A. G.; DEMUNER, L. H. (Ed.). **Café conilon**. Vitória: Incaper, p. 203-226, 2007b.

FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; VERDIM FILHO, A. C.; VOLPI, P. S. Origem, Dispersão, Taxonomia e Diversidade Genética de *Coffea canephora*. *In*: FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA. S. M.; FERRÃO, M. A. G.; DEMUNER, L. H. (Ed.). **Café conilon**. Vitória, ES: Incaper, p. 64- 91, 2007a.

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A.; MUNER, L. H. **Café conilon**. Vitória: INCAPER, 784 p., 2017.

FINI, A.; FERRINI, F.; FRANG, P.; AMOROSO, G.; GIORDANO, C. Growth, Leaf Gas Exchange and Leaf Anatomy of three Ornamental Shrubs Grown under different Light Intensities. **European Journal of Horticultural Science**, v. 75, n. 3, p.111-117, 2010.

FORCEA. DUALEX® SCIENTIFIC. **Manual do medidor eletrônico de clorofila DUALEX**, França, 20 p, 2018.

FURBANK, R. T.; TESTER, M. Phenomics – Technologies to relieve the phenotyping bottleneck. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 12, p. 635-644, 2011.

FU, X.; ZHOU, L.; HUANG, J.; MO, W.; ZHANG, J.; LI, J. Relating photosynthetic performance to leaf greenness in litchi: A comparison among genotypes. **Scientia Horticulturae**, v. 152, n. 16, p.16-25, 2013.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, n. 1, p.87-92, 1989.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GODOY, A. G. Respostas fisiológicas de cultivares de *coffea arabica*, em função da disponibilidade de luz e nitrogênio. **Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal**, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 2014. 64 p.

GOEL, N. S. Models of vegetation canopy reflectance and their use in estimation of biophysical parameters from reflectance data. **Remote Sensing Reviews**, v. 4, n. 1, p. 1- 21, 1988.

GOULAS, Y.; CEROVIC, Z. G.; CARTELAT, A.; MOYA, I. Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. **Applied Optics**, v. 43, n. 23, p.4488-4496, 2004.

HAWORTH, M.; MARINO, G.; BRUNETTI, C.; KILLI, D.; DE CARLO, A.; CENTRITTO, M. The Impact of Heat Stress and Water Deficit on the Photosynthetic

and Stomatal Physiology of Olive (*Olea europaea* L.) A Case Study of the 2017 Heat Wave. **Plants**, v. 7, n. 4, p. 76, 2018.

HUAN, Y.; HUA-SONG, W.; ZHI-JIE, W. Evaluation of SPAD and Dualex for In-Season Corn Nitrogen Status Estimation. **Acta Agronomica Sinica**, v. 38, n. 5, p.840-847, 2010.

JESUS, S. V.; MARENCO, R. J. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 4, p. 815-818, 2008.

KALAJI, H. M.; RASTOGI, A.; ŽIVČÁK, M.; BRESTIC, M.; DASZKOWSKA-GOLEC, A.; SITKO, K.; ALSHARAF, K. Y.; LOTFI, R.; STYPIŃSKI, P.; SAMBORSKA, I. A. CETNER, M. D. Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors. **Photosynthetica**, v. 56, n. 3, p.953-961, 2018.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. CHLOROPHYLL FLUORESCENCE AND PHOTOSYNTHESIS: The Basics. **Annal Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p.313-349, 1991.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS T. L. **Plant Physiological Ecology**. New York, Springer, 604 p., 2008.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C.; DOLL, M.; FIETZ, H. J.; BACH, T.; KOZEL, U.; MIER, D.; RAHMSDORF, U. Photosynthetic activity, chloroplasts ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. **Photosynthesis Research**, v.2, n.2, p. 115–141, 1981.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *In*: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in Enzymology**, San Diego, p.350-382, 1987.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v.11, n.5, p.591–592, 1983.

LI-COR. **LI-3100 Area Meter Instructional Manual**, Lincoln, 34 p, 1996.

LIMA, A. L. S.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A.; TOTOLA, M. R.; LOUREIRO, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, n. 3, p. 239-247, 2002.

LONG, S. P.; ORT, D. R. More than taking the heat: crops and global change. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 241-248, 2010.

MAFEI, M. M. Emissão de fluorescência e produção de massa seca em feijão e soja em função da aplicação de nitrogênio em cobertura. **Dissertação de Mestrado em Biologia**, Universidade Federal de Goiás - UFG, 2009. 36 p.

MARTINS, M. Q.; RODRIGUES, W. P.; FORTUNATO, A. S.; LEITÃO, A. E.; RODRIGUES, A. P.; PAIS, I. P.; MARTINS, L. D.; SILVA, M. J.; REBOREDO, F. H.; PARTELLI, F. L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M. A.; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A. I.; LIDON, F. J. C.; DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. C. Protective Response Mechanisms to Heat Stress in Interaction with High [CO₂] Conditions in *Coffea* spp. **Frontiers in Plant Science**, v. 29, p. 947-964, 2016.

MAXWELL, K. JONHSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal Of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p.659-668, 2000.

MELIS, A.; SPANGFORT, M.; ANDERSSON, B. Light-absorption and electron-transport balance between photosystem II and photosystem I in spinach chloroplasts. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, n. 1, p.129-136, 1987.

MIELKE, M. S.; SCHAFFER, B.; SCHILLING, A. C. Evaluation of reflectance spectroscopy indices for estimation of chlorophyll content in leaves of a tropical tree species. **Photosynthetica**, v. 50, n. 3, p. 343 – 352, 2012.

MOJENA R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977.

MOSS, D. N. Photosynthesis, respiration, and photorespiration in higher plants. *In*: TESAR, M. B. **Physiological Basis of Crop Growth and Development**. Madison: American Society of Agronomy, p. 131-152, 1984.

NAGESWARA RAO, R. C.; TALWAR, H. S.; WRIGHT, G. C. Rapid Assessment of Specific Leaf Area and Leaf Nitrogen in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) using a Chlorophyll Meter. **Journal Agronomy & Crop Science**, v. 186, n. 3, p.175-182, 2001.

NETTO, A. T.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J. G.; BRESSAN-SMITH, R. E. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll *a* fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 104, n. 2, p.199-209, 2005.

NIGAM, S. N.; ARUNA, R. Stability of soil plant analytical development (SPAD) chlorophyll meter reading (SCMR) and specific leaf area (SLA) and their association across varying soil moisture stress conditions in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v. 160, n. 1, p.111-117, 2008.

OUKARROUM, A; STRASSER, R. J. Phenotyping of dark and light adapted barley plants by the fast chlorophyll *a* fluorescence rise OJIP. **South African Journal Of Botany**, v. 70, n. 2, p.277-283, 2004.

PAIXÃO, J. S. Assimilação fotossintética do carbono, respiração foliar e crescimento de dois genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) contrastantes para o teor de clorofila no limbo da folha. **Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal**, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 2018. 102 p.

PASSIOURA, J. B. Grain yield, harvest index and water use of wheat. **Journal of Australian Institute of Agricultural Science** v. 43, n. p. 117–120, 1977.

PENG, S.; LAZA, M. R. C.; GARCIA, F. V.; CASSMAN, K. G. Chlorophyll meter estimates leaf area-based nitrogen concentration of rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 26, n. 5, p.927-935, 1995.

PETERSON, T. A.; BLACKMER, T. M.; FRANCIS, D. D.; SCHEPERS, J. S. Using a Chlorophyll Meter to Improve N Management. **Historical Materials from University of Nebraska- Lincoln Extension**, p.1-7, 1993.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; FONTES, E. P. B.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, v. 167, n. 6, p. 1307-1314, 2004.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with 4 different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 975, p. 384-394, 1989.

RICHARDSON, A. D.; DUGAN, S. P.; BERLYN, G. P. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. **New Phytologist**, v. 153, n.1, p.185-194, 2001.

RODRIGUEZ-LÓPEZ, N. F.; CAVATTE, P. C.; SILVA, P. E. M.; MARTINS, S. C. V.; MORAIS, L. E.; MEDINA, E.; DAMATTA, F. M. Physiological and biochemical abilities of robusta coffee leaves for acclimation to cope with temporal changes in light availability. **Physiologia Plantarum**, v. 149, n. 1, p. 45-55, 2012.

RUTTANAPRASERT, R.; BANTERNG, P.; JOGLOY, S.; VORASOOT, N.; KESMALA, T.; PATANOTHAI, A. Diversity of physiological traits in jerusalem artichoke genotypes under non-stress and drought stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 48, n. 1, p.11-20, 2016.

SCHMILDT, E.R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O.; SANTOS, J. S. Análise comparativa de equações para estimativa da área foliar em cafeeiros. **Coffee Science**, v. 9, n. 2, p. 155-167, 2014.

SILVA, D. V.; ANJOS, L.; BRITO-ROCHA, E.; DALMOLIN, A. C.; MILKE, M. S. Calibration of a multi-species model for chlorophyll estimation in seedlings of

Neotropical tree species using hand-held leaf absorbance meters and spectral reflectance. **IForest Biogeosciences and Forestry**, v. 9, n. 5, p.829-834, 2016.

SILVA, L.; MARCHIORI, P. E. R.; MACIEL, C. P.; MACHADO, E. C.; RIBEIRO, R. V. Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 9, p.965-972, 2010.

SIKUKU, P. A.; NETONDO, G. W.; ONYANGO, J. C.; MUSYIMI, D. M. chlorophyll fluorescence, protein and chlorophyll content of three nerica rainfed rice varieties under varying irrigation regimes. **ARPN Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 5, n. 2, p.19-25, 2010.

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

STIRBET, A.; LAZÁR, D.; KROMDJIK, J.; GOVINDJEE. Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? **Photosynthetica**, v. 56, n. 1, p. 86-104, 2018.

TAIZ, L. ZEIGER, E. MØLLER, I. M. MURPHY, A. Fotossíntese: reações luminosas. **Fisiologia Vegetal 6ªed**. Porto Alegre: Artmed, p. 171-199, 2017.

UPADHYAYA, H. D. Variability for Drought Resistance Related Traits in the Mini Core Collection of Peanut. **Crop Science**, v. 45, n. 4, p.1432-1440, 2005.

WATERHOUSE, A. L. Polyphenolics: determination of total phenolics. *In*: WROLSTARD, R. E. **Currente protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, p. 11-18, 2002.

WILHELM, C.; SELMAR, D. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 2, p. 79-87, 2011.

ZHU, X. G.; LONG, S. P.; ORT, D. R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 235-261, 2011.

9. ANEXO

Tabela 8: Equações de calibração não significativas determinadas em genótipos de *C. canephora* utilizando clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG e Dualex). Equações expressas em base de área e massa.

Método	Expresso	y	x	R ²	p valor	RMSE	Equação de calibração
ClorofiLOG	Área	ICTC	CAR	0.52	0.332	4.602	$1893267.8571x^2 - 119771.1893x + 1946.6554$
		ICa		0.64	0.214	1.198	$634767.8571x^2 - 40144.8893x + 674.4012$
		ICb		0.46	0.395	1.47	$1256803.5714x^2 - 79520.3393x + 1270.6090$
		ICTC		0.52	0.331	4.598	$5933.2262x^2 - 4848.0778x + 1042.0098$
		ICa		0.52	0.331	4.598	$5933.2x^2 - 4848.1x + 1042.0$
		ICb		0.53	0.395	3.21	$4236.8342x^2 - 3462.5515x + 719.3745$
	Área	ICTC	P	0.43	0.154	4.998	$683.50x - 2119$
		ICa		0.49	0.117	1.42	$220.116x + 1604$
		ICb		0.39	0.179	3.647	$463.07x - 37.19$
		ICTC		0.27	0.623	6.178	$446.7x^2 - 1323.8 + 1035.6$
		ICa		0.27	0.621	1.811	$110.4x^2 - 324.4x + 278.9$
		ICb		0.26	0.628	4.423	$335.6x^2 - 997.5x + 755.2$
	Massa	ICTC	FST	0.25	0.312	5.758	$-2.206x + 79.879$
		ICa		0.44	0.414	1.575	$-0.2454x^2 + 4.2954x + 23.6395$
		ICb		0.35	0.523	4.218	$-0.9039x^2 + 17.4635x - 65.7844$
		ICTC		0.47	0.381	5.364	$-0.006x^2 + 1.5603x - 31.7260$
		ICa		0.48	0.125	1.44	$-0.0691x + 50.3113$
		ICb		0.44	0.409	3.965	$-0.0052x^2 + 1.2760x - 59.0050$
Massa	ICTC	ETR	0.5	0.116	4.705	$0.4609x + 31.7819$	
	ICa		0.44	0.148	1.493	$0.1309x + 34.0914$	

Dua lex	Área	CAR	ICb	0.51	0.111	3.291	$0.3297x - 2.2936$
			ICTD	0.47	0.391	5.349	$1977696.4286x^2 - 125037.9607x + 2005.5992$
			IFLA	0.58	0.268	0.126	$57125.0000x^2 + 3624.9607x - 55.8712$
	Massa	CAR	IANT	0.63	0.228	0.015	$8071.4286x^2 + 507.7286x - 7.8472$
			ICTD	0.64	0.214	4.379	$7476.9390x^2 - 6094.5598x + 1269.0763$
			IFLA	0.65	0.212	0.116	$211.6654x^2 + 171.5135x - 33.0568$
	Área	P	ICTD	0.28	0.281	6.209	$603.27x - 34.84$
			IFLA	0.13	0.816	0.188	$-919.01x^2 + 220.49x - 11.71$
			IANT	0.19	0.723	0.024	$-178.463x^2 + 40.134x - 2.133$
	Massa	P	IBN	0.05	0.653	7.038	$266.113x - 5.036$
			ICTD	0.29	0.598	7.077	$-639.5x^2 - 1914.9x + 1463.6$
			IFLA	0.44	0.416	0.182	$-20.03x^2 + 61.49x - 45.51$
	Massa	P	IANT	0.44	0.416	0.025	$3.054x^2 + 9.208x - 6.803$
			IBN	0.29	0.597	7.241	$717.6x^2 - 2175.0x + 1667.6$
	Área	FST	ICTD	0.5	0.349	6.412	$-1.865x^2 + 36.534x - 139.646$
			IFLA	0.49	0.364	0.184	$0.0589x^2 - 1.18532x + 7.2949$
			IBN	0.6	0.247	6.275	$-2.113x^2 + 41.648x - 174.644$
	Massa	FST	ICTD	0.59	0.256	6.009	$1.062e-02x^2 + 2.633e+00x - 1.239e+02$
			IFLA	0.34	0.525	0.184	$0.0002x^2 - 0.0673x + 5.6554$
			IBN	0.59	0.265	5.951	$-1.036e-02x^2 + 2.567e+00x - 1.289e+02$
Área	ETR	ICTD	0.41	0.171	5.624	$0.4592x + 8.9418$	
		IFLA	0.19	0.721	0.179	$-0.0005x^2 + 0.0648x - 0.4985$	
		IANT	0.26	0.637	0.024	$-0.0001x^2 + 0.0147x - 0.2585$	
Massa	ETR	IBN	0.04	0.69	7.081	$0.1488x + 17.3294$	
