



DAYANE MEIRELES DA SILVA

**DEFICIÊNCIA DE MAGNÉSIO NA FISIOLOGIA
E NO METABOLISMO ANTIOXIDANTE DE
CULTIVARES DE CAFEIEIRO**

LAVRAS – MG

2013

DAYANE MEIRELES DA SILVA

**DEFICIÊNCIA DE MAGNÉSIO NA FISIOLOGIA E NO
METABOLISMO ANTIOXIDANTE DE CULTIVARES DE CAFEEIRO**

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

Orientador

Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS – MG

2013

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

Silva, Dayane Meireles da.

Deficiência de magnésio na fisiologia e no metabolismo
antioxidante de cultivares de cafeeiro / Dayane Meireles da Silva. –
Lavras : UFLA, 2013.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Particionamento de carboidratos. 2. Crescimento. 3. Clorofila.
4. Solução nutritiva. 5. Estresse oxidativo. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 583.5204133

DAYANE MEIRELES DA SILVA

**DEFICIÊNCIA DE MAGNÉSIO NA FISIOLOGIA E NO
METABOLISMO ANTIOXIDANTE DE CULTIVARES DE CAFEIEIRO**

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

APROVADA em 31 de julho de 2013.

Dr. Renato Paiva

UFLA

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho
(Pesquisadora)

EMBRAPA Café

Dr. José Donizeti Alves
Orientador

LAVRAS - MG

2013

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional...

OFEREÇO

*Ao Felipe, pelo incentivo nas horas de desânimo, consolo nos momentos de
tristeza e presença nas alegrias das minhas conquistas...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e luz do meu caminho.

À minha família, pelo incentivo e apoio essenciais para a realização deste sonho.

Aos meus sobrinhos, por encherem minha vida de alegria.

Ao Felipe, pelo amor e companheirismo.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos, à UFLA, pela oportunidade de estudo e ao Setor de Fisiologia Vegetal, pelo crescimento profissional e pessoal.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e a todos outros, por me guiarem na busca pelo conhecimento.

Ao orientador, Prof. Dr. José Donizeti Alves, pelos ensinamentos, confiança e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição intelectual.

Ao Prof. Dr. Antônio Furtini Neto, pelo auxílio e pela valiosa contribuição.

À Isabel, Kamila e Meline pela amizade, disponibilidade e ajuda para a realização deste trabalho. À Cinthia, Helbert, Sandro, Lorena, Lissa e Jéssica pela ajuda na condução dos experimentos.

Às amigas, Marina, Ana Luísa, Tássia, Fernanda, Patrícia, Gabriela e Ana Flávia, que fizeram meus dias em Lavras mais felizes.

Aos colegas de pós-graduação, pela convivência e pelo aprendizado em conjunto.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia vegetal pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão desta etapa, minha gratidão.

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os impactos bioquímicos e fisiológicos, em mudas de *Coffea arabica* L., cultivares Catuai e Acaiá, frente à deficiência de magnésio (Mg). Dessa maneira, mudas com seis meses de idade foram transferidas para recipientes plásticos, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon. Na imposição dos tratamentos, foram utilizadas soluções completa e com a exclusão do nutriente Mg. As avaliações foram realizadas em folhas totalmente expandidas e em raízes no início do tratamento e após 10, 20 e 30 dias. Foram avaliadas as alterações no particionamento de carboidratos, sistema antioxidante, crescimento, acúmulo de massa seca e conteúdo de clorofilas e carotenoides das plantas expostas a esse estresse, bem como nas plantas controle. Uma das características iniciais da deficiência em Mg foi um aumento na relação de massa seca parte aérea/raiz, o que pode estar relacionado ao acúmulo de carboidratos nas folhas. É provável que esse acúmulo seja responsável por desencadear uma redução no consumo de equivalentes redutores, oferecendo condições favoráveis para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). O aumento na produção de EROs foi acompanhado por aumentos na concentração de ascorbato e na atividade das enzimas do metabolismo antioxidante. A cultivar Catuai é mais sensível à deficiência de magnésio, do que a Acaiá, uma vez que as mudas desta cultivar apresentaram redução no crescimento e uma atividade menos eficiente do metabolismo antioxidante na remoção das EROs quando expostas à deficiência em Mg.

Palavras-chave: Particionamento de carboidratos. Crescimento. Clorofila. Solução nutritiva. Estresse oxidativos.

ABSTRACT

The present work had as objective to study evaluate the biochemical and physiological impacts in plants of *Coffea arabica* L. cultivars Catuaí and Acaiá, front deficiency of magnesium (Mg). Thus, plants with six months of age were transplanted into plastic recipient with a capacity of 10 L containing nutrient solution of Hoagland and Arnon. The evaluations were performed on fully expanded leaves and roots at the beginning of treatment and after 10, 20 and 30 days. We evaluated the changes in partitioning of carbohydrates, antioxidant system, growth, dry matter accumulation and content of chlorophylls and carotenoids from plants exposed to this stress, as well as in control plants. One of the initial reactions of Mg deficiency was an increase in the shoot/root dry weight ratio, which may be related to the accumulation of carbohydrates in leaves. It is likely that this accumulation cause a reduction in the consumption of reducing equivalents that offer favorable conditions for the generation of highly reactive O₂ species (ROS). The increase in production of ROS was accompanied by increases in ascorbate concentration and activity of enzymes of antioxidant metabolism. The Catuaí is more sensitive to magnesium deficiency of the Acaiá, since this cultivar plants showed reduced growth and activity of the antioxidant metabolism less efficient in the removal of reactive oxygen species when exposed to magnesium deficiency.

Keywords: Partitioning of carbohydrates. Growth. Chlorophyll. Nutrient solution. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Gráfico 1	Efeitos da deficiência em Mg nos teores foliares de magnésio de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaiá.....	24
Gráfico 2	Efeitos da deficiência de Mg no número total de folhas (A) e na área foliar total (B) de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaiá.....	26
Gráfico 3	Efeitos da deficiência de Mg na altura de plantas (A) e no comprimento da raiz (B) de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaiá	29
Gráfico 4	Efeitos da deficiência de Mg na massa seca da parte aérea (A) e da raiz (B), e na relação de massa seca parte aérea/raiz (C) de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaiá.....	32
Gráfico 5	Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos foliares de clorofila “a” (A) e “b” (B) de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaiá	35
Gráfico 6	Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos foliares de carotenoides (A) e na relação carotenoides/clorofila (B) de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaiá.....	37
Gráfico 7	Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos foliares de sacarose (A), açúcares solúveis totais (B), açúcar redutor (C) e amido (D) de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaiá.....	40
Gráfico 8	Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos radiculares de sacarose (A), açúcares solúveis totais (B), açúcar redutor (C) e amido (D) de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaiá.....	42
Gráfico 9	Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos foliares de peróxido de hidrogênio (A), ascorbato (B) e malondialdeído (C) de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaiá.....	46

Gráfico 10 Efeitos da deficiência de Mg na atividade das enzimas dismutase do superóxido (A), catalase (B) e peroxidase do ascorbato (C) de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí e Acaíá 48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Condução do experimento	17
3.1.1	Teores de magnésio	18
3.1.2	Crescimento vegetativo	19
3.1.3	Clorofilas e carotenoides	19
3.1.4	Carboidratos	19
3.1.5	Peróxido de hidrogênio	20
3.1.6	Ascorbato	20
3.1.7	Peroxidação lipídica	21
3.1.8	Enzimas antioxidantes	21
3.1.8.1	Dismutase do superóxido (SOD)	22
3.1.8.2	Catalase (CAT)	22
3.1.8.3	Peroxidase do ascorbato (APX)	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Teores de magnésio	24
4.2	Crescimento vegetativo	25
4.3	Clorofilas e carotenoides	33
4.4	Carboidratos	38
4.5	Metabolismo antioxidante	45
5	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Considerando a grande extensão territorial, utilizada para o cultivo do cafeeiro, os problemas ligados às adversidades edafoclimáticas são os mais variáveis e se relacionam a diferentes elementos, dentre eles as deficiências e desequilíbrios nutricionais. Nesse contexto, o fornecimento adequado de nutrientes minerais é de grande importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas (WEILL, 1990).

O magnésio exerce uma importante influência no particionamento de carboidratos e na alocação de biomassa entre parte aérea e raiz. Uma das características iniciais da deficiência em Mg é um aumento na relação de massa seca parte aérea/raiz, que pode estar relacionado ao acúmulo de carboidratos em folhas, especialmente sacarose e amido (CAKMAK; KIRBY, 2008).

Em estudos são demonstrados que a alteração no particionamento de carboidratos pode ser desencadeada por uma redução na exportação de sacarose via floema de órgãos fonte para os órgãos dreno (CAKMAK; HENGELER; MARSCHNER, 1994a, 1994b; HERMANS et al., 2004). O mecanismo pelo qual a deficiência em Mg afeta o carregamento de sacarose no floema, ainda, não está totalmente compreendido, mas pode estar relacionado à baixa concentração do complexo Mg-ATP nos locais de carregamento do floema (CAKMAK; YAZICI, 2010).

É provável que esse acúmulo de carboidratos seja responsável por desencadear uma redução no consumo de equivalentes redutores, oferecendo condições favoráveis para a formação de espécies reativas de oxigênio – EROs (MITTLER, 2002). Visando neutralizar os efeitos dessas EROs, as plantas apresentam um sistema de defesa antioxidante, composto por enzimas e moléculas antioxidantes, no entanto, em condições de estresse severo ou

prolongado pode ocorrer o desequilíbrio entre a produção e a remoção de EROs (CAKMAK; KIRBY, 2008).

Embora a deficiência de magnésio na cultura do cafeeiro tenha se tornado uma constante, estudos fisiológicos que mostrem os efeitos desse estresse, ainda, são inexistentes. Desta maneira, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar as respostas bioquímicas e fisiológicas em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí 144 e cv. Acaiá 474/19), frente à deficiência de magnésio. Para tanto, foram avaliadas as alterações no particionamento de carboidratos, sistema de defesa antioxidante, crescimento, acúmulo de massa seca e conteúdo de pigmentos fotossintetizantes das plantas expostas a esse estresse, bem como nas plantas controle.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O magnésio (Mg) é um macronutriente que desempenha várias funções nas plantas como: a) constituinte da molécula de clorofila, b) controle do pH celular, c) síntese de proteínas, d) ativação de enzimas envolvidas na respiração, fotossíntese e, principalmente, aquelas envolvidas na transferência de grupos fosfatos (fosfatases e ATPases) (MARSCHNER, 1995).

A função mais familiar do Mg nas plantas, certamente, é a participação na molécula de clorofila, porém, apenas uma pequena proporção, cerca de 15 a 20% do Mg total, está ligado a esta molécula, que se encontra nas membranas dos tilacoides nos cloroplastos (WHITE; BROADLEY, 2009), e esse percentual pode ser maior ou menor dependendo da quantidade de Mg na planta. O citoplasma é outro compartimento que pode ter de 10 a 20% do Mg e o restante está localizado no vacúolo celular (MARSCHNER, 1995).

Os sintomas da deficiência em Mg, na maioria das plantas, fazem sua primeira aparição nas folhas totalmente expandidas e, sistematicamente, progridem a partir delas para as mais jovens, sendo um sintoma característico à clorose internerval (BENNETT, 1997).

Na síntese de proteínas, o Mg, também, é exigido para a ligação das subunidades ribossômicas e para a formação da RNA polimerase (MAATHUIS, 2009). Assim sendo, em função de alterações na síntese de proteínas, a proporção de nitrogênio proteico diminui e a quantidade de nitrogênio não proteico aumenta em folhas deficientes em Mg (TERRY; ULRICH, 1974).

As reações de ativação enzimática e transferência energética, também, necessitam de Mg e podem ser de transferência de grupos fosfatos (fosfatases e ATPases) ou grupos carboxílicos (carboxilases). Nessas reações o Mg atua como ligante preferencial entre a base nitrogenada e o grupo fosforil (MARSCHNER, 1995). Na síntese de ATP, também, é exigido um requerimento de Mg como um

componente da ligação entre o ADP e a enzima (IGAMBERDIEV; KLECZKOWSKI, 2003).

O Mg, também, afeta a modulação da atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase no estroma de cloroplastos, sendo nesse caso a ativação da enzima dependente de Mg e pH. A ligação do Mg com a enzima aumenta a afinidade pelo CO₂ e duplica a taxa de velocidade máxima da reação (SUGIYAMA; NAKAYAMA; AKAZAWA, 1968). A ativação da frutose-1,6-bifosfatase que em cloroplastos regula o particionamento de assimilados entre a síntese de amido e a exportação de triose fosfatos, também, é regulada por altas concentrações de Mg e altos valores de pH (GERHARDT; STITT; HELDT, 1987).

Em muitos casos, com o início do estresse pela deficiência em Mg, o particionamento de carboidratos para as raízes é reduzido, levando a um aumento distinto na relação de massa seca entre parte aérea e raiz (CAKMAK; HENGELER; MARSCHNER, 1994b; FISCHER et al., 1998; RIGA; ANZA, 2003). Em beterraba, a deficiência em Mg causa um acúmulo massivo de sacarose e amido nas folhas à medida que a concentração de Mg é reduzida. E esse acúmulo de açúcares ocorre em conformidade com a inibição severa da exportação de sacarose das folhas para as raízes (HERMANS et al., 2005). O acúmulo de carboidratos em folhas deficientes ocorre antes de qualquer efeito no crescimento (CAKMAK; HENGELER; MARSCHNER, 1994a, 1994b; HERMANS; VERBRUGGEN, 2005).

O massivo acúmulo de fotossintatos em folhas de plantas deficientes em Mg pode alterar o metabolismo fotossintético e reduzir o uso da energia luminosa absorvida na fotossíntese, que pode induzir uma saturação da cadeia de transporte de elétrons com acúmulo de NADPH (HERMANS; VERBRUDGEN, 2005). Altos níveis de equivalentes redutores e componentes da cadeia de transporte de elétrons saturados oferecem condições favoráveis para a formação

de espécies reativas de oxigênio – EROs (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998; MITTLER, 2002). Dentre as principais EROs que causam danos celulares pela oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, destacam-se o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (APEL; HIRT, 2004).

As EROs são altamente citotóxicas e podem reagir com várias biomoléculas, entre elas, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, causando peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e mutações no DNA, respectivamente (BREUSEGUEM et al., 2001; QUILES; LÓPEZ, 2004). Evidências sugerem que as membranas são o principal alvo da injúria (CANDAN; TARHAN, 2003), uma vez que as EROs podem reagir com ácidos graxos insaturados desencadeando a peroxidação lipídica nas membranas plasmática e intracelular de organelas (KARABAL; YÜCEL; ÖKTEM, 2003). A peroxidação da membrana plasmática leva ao extravasamento do conteúdo celular, rápida dessecação e morte celular, enquanto que danos na membrana intracelular podem afetar a atividade respiratória da mitocôndria, deterioração de pigmentos e perda da capacidade de fixação do carbono no cloroplasto (FOYER; NOCTOR, 2000; SCANDALIOS, 1993).

Assim sendo, as plantas desenvolveram diferentes sistemas de defesa antioxidantes para remover as EROs e minimizar seus danos celulares. O sistema antioxidante enzimático é um dos mecanismos de proteção, incluindo a dismutase do superóxido (SOD), que pode ser encontrada em vários compartimentos celulares e catalisa a dismutação de O_2^- a H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 é convertido em O_2 e H_2O pela ação das catalases (CAT), diversas peroxidases e pelo ciclo ascorbato-glutationa. Esse ciclo é caracterizado por uma série de reações redox acopladas, envolvendo as enzimas peroxidase do ascorbato (APX), redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do

dehidroascorbato (DHAR), redutase da glutatona (GR) e o ascorbato (CANDAN; TARHAN, 2003; JIMÉNEZ et al., 1998).

Embora as EROs sejam produtos inevitáveis do metabolismo vegetal (MARTINEZ et al., 2001), em condições normais, a sua produção e remoção são bem equilibradas (MITTLER, 2002). Entretanto, em condições de estresse, a produção de EROs pode superar os mecanismos de remoção desencadeando o estresse oxidativo (ESFANDIARI; SHOKRPOUR; ALAVI-KIA, 2010).

Aumentos na atividade do sistema antioxidante pela deficiência em Mg foram reportados por Candan e Tarhan (2003) em *Mentha* sp., Riga e Anza (2003) em *Pipper* sp., Tewari, Kumar e Sharma (2006) em plantas de amora e por Chou et al. (2011) em arroz. Em feijão, este aumento foi observado logo no estágio inicial da deficiência, podendo ser considerado uma das primeiras respostas fisiológicas e bioquímicas a esse estresse (CAKMAK; MARSCHNER, 1992). Essa rápida resposta das plantas pode ser responsável por reprimir os danos fotooxidativos mediados pelas EROs e, conseqüentemente, evitar a inativação das enzimas fotossintéticas, o que explicaria porque a fotossíntese é afetada pela deficiência em Mg, tardiamente, quando comparada com o acúmulo de açúcares (HERMANS et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do experimento

Mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí 144 e cv. Acaia 474/19), com seis meses de idade, foram obtidas do Viveiro Charneca, município de Três Pontas – Minas Gerais. As mudas foram cultivadas em sacos de polipropileno de 500 mL, com dimensões de cinco cm de diâmetro e 12 cm de altura. O substrato utilizado foi o padrão para mudas de cafeeiro, constituído de terra de subsolo peneirada e esterco de curral curtido e peneirado nas proporções 2:1, acrescido cloreto de potássio e superfosfato simples nas proporções 1:10 (GUIMARÃES; MENDES; SOUZA, 2002).

Mudas selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e de vigor, foram transferidas para recipientes plásticos com capacidade de dez litros, com dimensões de 33 cm de largura, 31 cm de altura e 38 cm de comprimento, contendo solução nutritiva de Hoaglang e Arnon (1950). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com as condições controladas. Antes da imposição dos tratamentos, as mudas passaram por um período de aclimação com duração de 28 dias, nos quais foram utilizadas soluções com concentrações crescentes, começando com $\frac{1}{4}$ da força, durante sete dias, $\frac{1}{2}$ força por sete dias e força completa por 14 dias.

Plantas aclimatadas foram submetidas a dois tratamentos, constituídos por soluções controle e deficiente em magnésio. Para o tratamento controle, foram utilizadas as concentrações originais da solução nutritiva, enquanto que no tratamento de deficiência foi utilizada a mesma solução, porém com a exclusão do nutriente magnésio. O volume da solução nutritiva, nos recipientes plásticos, foi mantido pela reposição diária com água deionizada. O pH da solução foi ajustado, diariamente, para $5,5 \pm 0,5$ com solução de NaOH 1 mol L⁻¹.

¹, as soluções foram trocadas, semanalmente e mantidas sob aeração constante durante todo o período experimental.

As avaliações foram realizadas em folhas totalmente expandidas e em raízes no início do tratamento e após 10, 20 e 30 dias de imposição dos tratamentos. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x2x4, sendo duas cultivares (Catuaí e Acaiá), dois tratamentos (controle e deficiente em Mg) e quatro tempos (0, 10, 20 e 30 dias), totalizando 16 tratamentos com três repetições. Cada parcela experimental foi constituída por cinco plantas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (FERREIRA, 2011). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 0,05 de probabilidade.

3.1.1 Teores de magnésio

Os teores foliares de magnésio foram determinados, conforme Malavolta, Vitti e Oliveira (1989), onde 500 mg de material seco e moído foram levados para tubo de digestão e foram adicionados 6 mL de uma mistura de HNO₃ e HClO₄ na proporção de 2:1 (v/v). Em seguida, as amostras foram levadas para bloco digestor aumentando, gradativamente, a temperatura até atingir 160°C e ficaram nessa temperatura até o volume ser reduzido à metade (cerca de 40 minutos). A temperatura foi aumentada para 210°C e mantida nesta temperatura até que se obtiveram fumos brancos de HClO₄ e o extrato apresentou-se incolor (cerca de 20 minutos). Após esfriar, o extrato foi transferido para balão volumétrico de 50 mL. O volume do balão volumétrico foi, então, completado com água deionizada. A determinação do conteúdo de magnésio foi feita por espectrometria de absorção atômica.

3.1.2 Crescimento vegetativo

As medidas de altura das plantas e do comprimento das raízes foram obtidas tomando-se o comprimento entre o coleto e o ápice foliar e entre o coleto e o ápice da raiz primária, respectivamente. A área foliar total foi estipulada pela fórmula $AF = [(comprimento \times largura) \times 0,667] \times \text{número total de folhas por planta}$ (BARROS et al., 1973; GOMIDE et al., 1977), e o número total de folha foi obtido por contagem direta.

A massa seca de raiz e parte aérea (caule e folhas) foi obtida de amostras secas em estufa de ventilação forçada a 70°C até peso constante.

3.1.3 Clorofilas e carotenoides

Para a determinação dos teores de clorofila, foram macerados 0,1 g de tecido foliar do primeiro par de folhas completamente expandido de cada tratamento em acetona 80%. O volume final foi completado para 10 mL, sendo realizadas as leituras espectrofotométricas a 645 e 663 nm e, para os teores de carotenoides, foram realizadas leituras a 445 nm, conforme metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001).

3.1.4 Carboidratos

Os carboidratos foram extraídos da massa seca de folhas completamente expandidas e raízes pela homogeneização de 200 mg de massa seca em 5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM, pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40°C. O homogenato foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos,

coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por duas vezes e os sobrenadantes, combinados.

Para extração do amido, o pellet foi, novamente, ressuspensionado com 8 mL do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8. Em seguida foram adicionadas 16 unidades da enzima amiloglucosidase, incubando-se em banho-maria a 40°C por duas horas. Após a centrifugação a 5.000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o volume completado para 15 mL.

Para a quantificação do amido, sacarose e açúcares solúveis totais foi utilizado o método da Antrona (DISCHE, 1962) e para os açúcares redutores o protocolo descrito por Miller (1959), por meio do método DNS.

3.1.5 Peróxido de hidrogênio

Matéria fresca de folhas (200 mg) foram macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 5 mL de TCA e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

3.1.6 Ascorbato

A concentração de ascorbato foi determinada, conforme descrito por Arakawa et al. (1981). 50 mg de tecido de material fresco de folhas foram macerados em TCA 5% (m/v) e o homogeneizado centrifugado a 10.000 g, por 15 minutos, a 4°C. Aliquotas (40 µL) do sobrenadante foram adicionadas ao

meio de reação composto por TCA 5% (m/v), etanol 99,8% (v/v), ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,4% em etanol (v/v), bathophenantrolina 0,5% em etanol (p/v) e FeCl_3 0,03% em etanol (m/v), a mistura foi homogeneizada vigorosamente e incubada a 30°C, por 90 minutos. As leituras foram realizadas a 534 nm.

3.1.7 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada, por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Duzentos miligramas de folhas foram macerados em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas (250 μL) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação [0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA], incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[\text{MDA}] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1).

3.1.8 Enzimas antioxidantes

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2 g de folhas, às quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração

contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µL de EDTA 0,1 M (pH 7,0), 6 µL de DTT 0,5 M, 12 µL de PMSF 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

3.1.8.1 Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), em um meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. Os tubos com o meio de reação e 10 µL de amostra foram iluminados, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

3.1.8.2 Catalase (CAT)

A CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 10 µL do extrato enzimático foi adicionada a 950 µL do meio de incubação, contendo 500 µL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 µL de peróxido de hidrogênio 12,5 mM, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima

foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.1.8.3 Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 10 μL do extrato enzimático foi adicionada a 950 μL de tampão de incubação composto por 500 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 50 μL de ácido ascórbico 10 mM e 50 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teores de magnésio

Os teores foliares de magnésio nas mudas de Catuai e Acaiá cultivadas após 30 dias sob condição de deficiência desse elemento foram, respectivamente, de 2,8 e 3,1 g Kg⁻¹, enquanto que nas mudas controle esses teores foram de 4,0 e 3,9 g Kg⁻¹ (Gráfico 1). Faixas de suficiência para teores adequados de Mg em folhas de cafeeiros, normalmente, variam entre 3,1 e 5,2 g.Kg⁻¹ (MALAVOLTA, 1993; MARTINEZ et al., 2003, 2004). Os resultados encontrados mostram que a partir de 20 dias, após a suspensão do fornecimento de Mg, as mudas de cafeeiros entraram em um processo de deficiência.

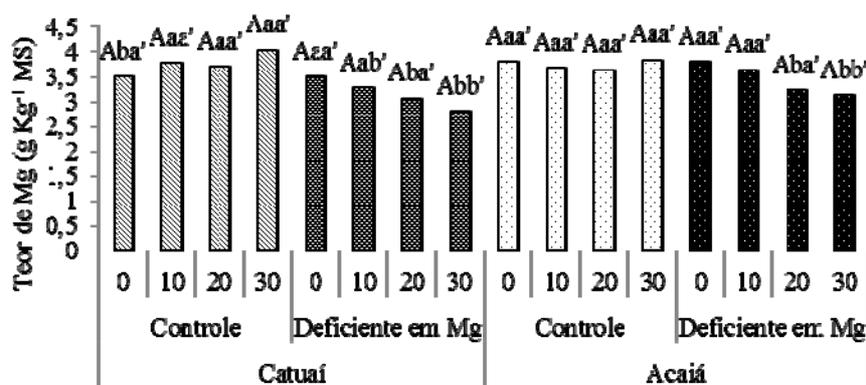


Gráfico 1 Efeitos da deficiência em Mg nos teores foliares de magnésio de mudas de cafeeiro cultivares Catuai e Acaiá

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofo o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada

cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

4.2 Crescimento vegetativo

Independentemente do tratamento e das cultivares, o número total de folhas aumentou com o tempo, elevando-se, significativamente, a partir do 20º dia para as plantas controle e a partir do 30º dia para as plantas submetidas à deficiência em Mg (Gráfico 2A). Já a área foliar não variou com a evolução do experimento, exceto na última amostragem (30º dia), onde, independentemente do tratamento e da cultivar, houve aumentos significativos. Nessa amostragem, as cultivares responderam de forma diferente na presença e ausência do Mg (Gráfico 2B). Ao final do experimento, o número total de folhas (Gráfico 2A) e a área foliar total (Gráfico 2B) de mudas de Catuaí foram maiores 11% e 33%, respectivamente, no tratamento controle que no deficiente. Para as mudas de a cultivar Acaíá esse número não variou com os tratamentos.

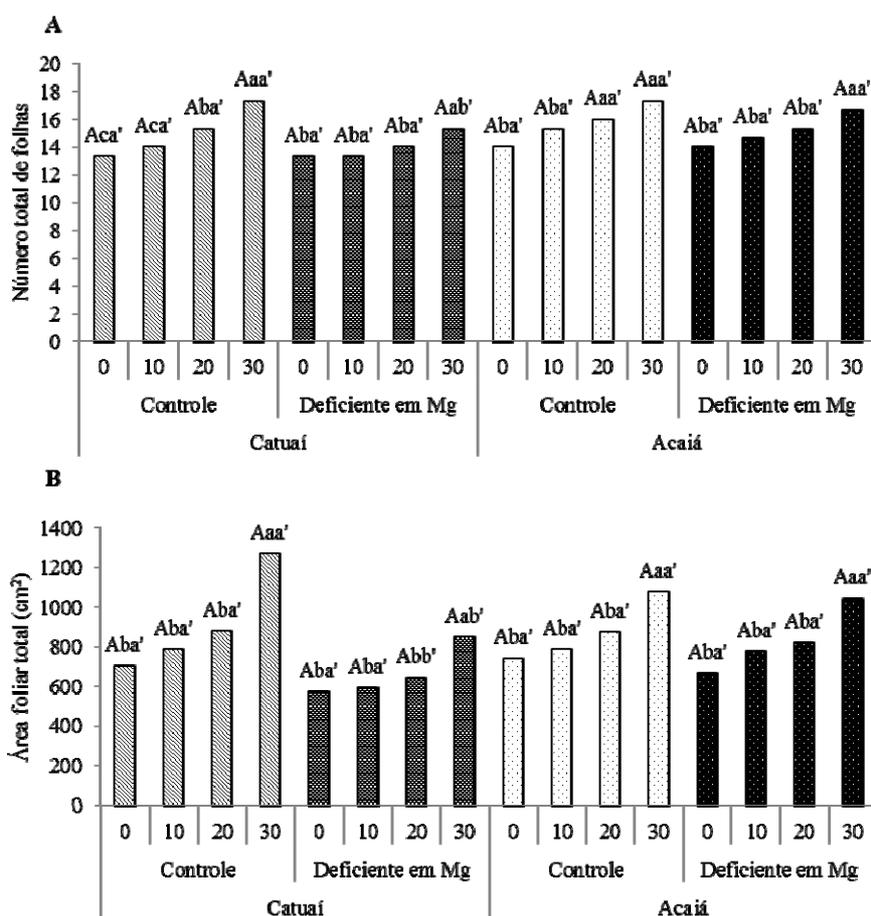


Gráfico 2 Efeitos da deficiência de Mg no número total de folhas (A) e na área foliar total (B) de mudas de café cultivares Catuaí e Acaíá

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofe o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

Ao contrário do que se observou no tratamento controle, a deficiência de Mg não alterou a altura das mudas de Catuaí ao longo do período experimental. Já em mudas de Acaiá, observou-se um aumento na altura das mudas aos 20 dias, independentemente da presença ou não do Mg na solução. Ao final do experimento, as mudas de Catuaí, no tratamento controle, apresentaram-se 28% mais altas, quando comparadas às mudas deficientes, enquanto que nas de Acaiá essa diferença não foi observada. Além disso, a altura das plantas foi maior na cultivar Acaiá, quando comparada à Catuaí, no início do tratamento controle, bem como em todos os tempos do tratamento com deficiência em Mg (Gráfico 3A).

Não foram observadas diferenças significativas nos comprimentos das raízes de mudas de Catuaí crescidas na ausência de Mg ao longo do período experimental. Por outro lado, em mudas de Acaiá, foram observados aumentos significativos a partir do 10º dia. Dessa forma, o comprimento da raiz foi maior na cultivar Acaiá, quando comparada à Catuaí, a partir do 20º dia do tratamento com deficiência em Mg. Ao final do experimento, diferenças significativas entre os tratamentos somente foram observadas para a cultivar Catuaí, onde as mudas deficientes apresentaram uma redução de 9% no comprimento radicular (Gráfico 3B).

Os resultados de crescimento de mudas de a cultivar Catuaí indicaram que a deficiência em magnésio reduziu o crescimento vegetal (Gráficos 2A, 2B, 3A e 3B), corroborando com trabalhos envolvendo outras espécies como pinus (SUN; PAYN, 1999), beterraba (HERMANS et al., 2005; HERMANS; VERBRUGGEN, 2005) e citrus (YANG et al., 2012). Interessantemente, o crescimento de plantas de a cultivar Acaiá não foi afetado pela deficiência em Mg (Gráficos 2A, 2B, 3A e 3B), dessa forma, nossos resultados mostraram que a cultivar Catuaí é mais sensível, quando comparada à cultivar Acaiá.

Considerando-se a produção vegetal, o aparecimento de clorose foliar somente em fases mais tardias da deficiência em Mg, como no caso deste trabalho, em que a clorose se tornou levemente aparente ao 20º dia, constitui-se um problema crítico aos produtores, uma vez que a redução do crescimento das raízes ocorre já nas fases iniciais da deficiência (Gráficos 2A, 2B, 3A e 3B). Diante da importância de um bom sistema radicular para a produção vegetal, atenção especial deve ser dada ao estado nutricional das plantas em relação ao Mg independentemente do desenvolvimento de qualquer sintoma visual de deficiência (CAKMAK; YAZICI, 2010).

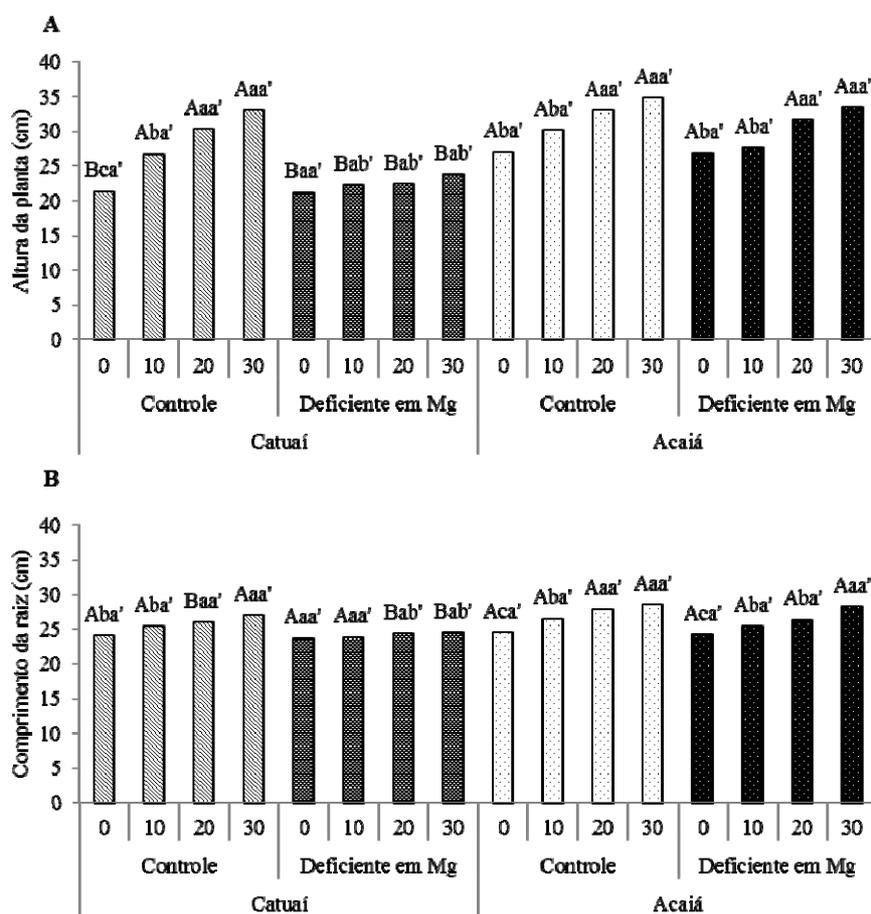


Gráfico 3 Efeitos da deficiência de Mg na altura de plantas (A) e no comprimento da raiz (B) de mudas de café cultivares Catuaí e Acaí

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofe o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

Entre os fatores ambientais, a nutrição mineral é o principal determinante da alocação de biomassa no vegetal (LÓPEZ-BUCIO; CRUZ-RAMIREZ; HERRERA-ESTRELA, 2003; MARSCHNER et al., 1995), sendo o status de Mg responsável por um pronunciado impacto no transporte e utilização de fotossintatos, alterando, marcadamente, o particionamento de carboidratos entre órgãos fonte e dreno (CAKMAK; KIRBY, 2008).

Aos 10 dias de experimento, as mudas controle de Catuaí tiveram um aumento significativo na massa seca da parte aérea, enquanto que as mudas deficientes permaneceram no mesmo patamar durante todo o experimento. Apesar de apresentarem a mesma tendência com a evolução do experimento, nas três últimas avaliações, os valores de massa seca das mudas sob deficiência de Mg apresentaram, em média, 26% menores, em comparação ao controle (Gráfico 4A).

Por outro lado, as mudas de Acaíá mostraram, de maneira geral, um acúmulo progressivo na matéria seca da parte aérea até a penúltima avaliação. Na média dos valores, bem como na última avaliação, não foram encontradas diferenças significativas para essa característica entre mudas crescidas na presença e na ausência de Mg. Dessa forma, o acúmulo de massa seca da parte aérea foi superior na cultivar Catuaí, durante todo o período experimental do tratamento controle e durante os primeiros 10 dias do tratamento deficiente em Mg, situação essa que se inverteu a partir do 20º dia do tratamento deficiente (Gráfico 4A).

No que se refere ao acúmulo de massa seca de raízes, não foram observados, para ambas as cultivares, aumentos significativos desta característica, ao longo do experimento, a exemplo do que aconteceu com as mudas controle aos dez dias. Entretanto, nas mudas de Catuaí, deficientes em Mg, os valores de massa seca das raízes foram inferiores, em média, 56% aos das plantas onde o nível desse elemento estava normal. Já para as de Acaíá, não

foram detectadas diferenças significativas entre as mudas controle e deficientes em Mg. Assim sendo, o acúmulo de massa seca de raízes, a cultivar Acaiá, apresentou maiores valores no tempo zero sob condição controle e durante todo o período experimental sob deficiência de magnésio, em relação à cultivar Catuaí (Gráfico 4B).

A relação massa seca parte aérea/raiz na cultivar Catuaí foi maior nas plantas deficientes, quando comparadas às controle, especialmente ao final do experimento, quando a relação foi 102% maior nas plantas deficientes, quando comparadas às plantas controle. Para a Acaiá, a única diferença estatística foi observada aos 20 dias de experimentação, nas demais, essas relações foram semelhantes (Figura 4C).

A deficiência em Mg não afetou, significativamente, o acúmulo de massa seca nas plantas da cultivar Acaiá, enquanto que induziu a redução no acúmulo de massa seca nas plantas da cultivar Catuaí, pela comparação com o tratamento controle (Gráficos 4A e 4B). Esta redução teve maior efeito na raiz (56%), quando comparada à parte aérea (26%), desencadeando um aumento (102%) na relação de massa seca entre parte aérea e raiz (Gráfico 4C).

O menor acúmulo de massa seca em raízes de plantas deficientes em Mg, constatado na cultivar Catuaí (Gráficos 4A, 4B e 4C), também, foi descrito em outras espécies tais como feijão (CAKMAK; HENGELER; MARSCHNER, 1994b), espinafre (FISCHER et al., 1998), pimenta (RIGA; ANZA, 2003) e amora (TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2006). Entretanto, em contraste com o encontrado, estudos com *Arabidopsis thaliana* (HERMANS; VERBRUGGEN, 2005) e beterrada (HERMANS et al., 2005) mostraram que a deficiência em Mg ocasionou redução da produção de massa seca da parte aérea, quando comparada com a raiz, levando ao decréscimo na relação de massa seca parte aérea/raiz.

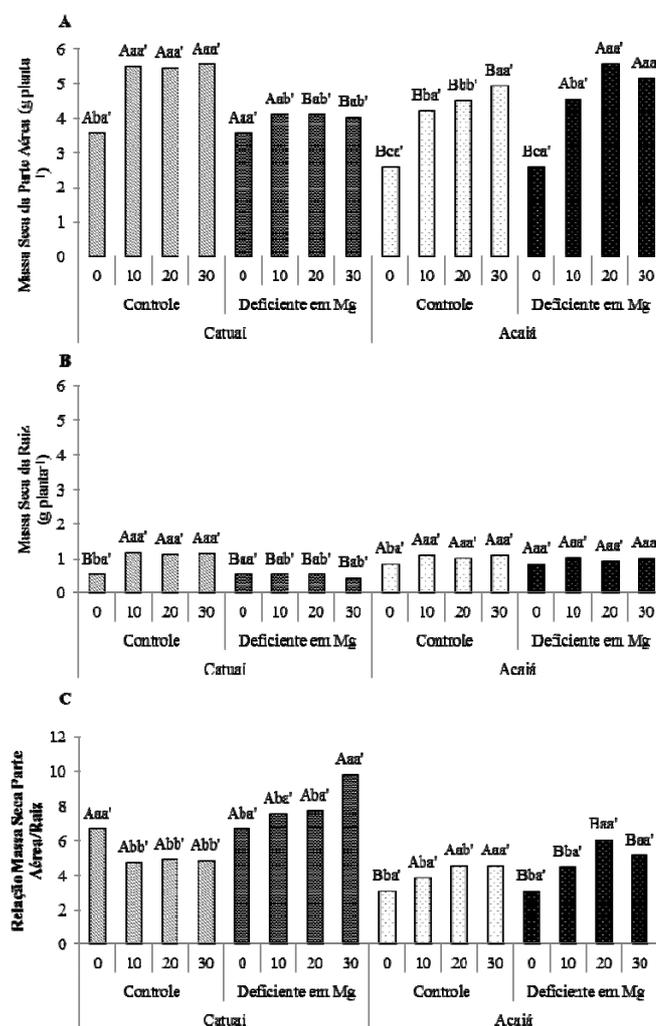


Gráfico 4 Efeitos da deficiência de Mg na massa seca da parte aérea (A) e da raiz (B), e na relação de massa seca parte aérea/raiz (C) de mudas de café cultivares Catuaí e Acaí

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofo o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

4.3 Clorofilas e carotenoides

Mudas de Catuaí submetidas a 10 dias de deficiência de Mg apresentaram decréscimos significativos nos teores de clorofila “a” cujos valores permaneceram constantes até o final do experimento. Por outro lado, em plantas de Acaiá submetidas à deficiência em Mg, os teores desses pigmentos permaneceram inalterados durante todo o período experimental. Nas testemunhas observou-se uma manutenção em sua concentração até os 20 dias e na última avaliação, um aumento significativo. Ao final do experimento, os valores desse pigmento foram menores 36% (Catuaí) e 25% (Acaiá) nas mudas deficientes, quando comparadas às controle (Gráfico 5A).

Em relação aos valores de clorofila “b”, tanto para as mudas de Catuaí controle quanto aquelas deficientes em Mg, a mesma tendência foi observada, decréscimo na segunda avaliação, seguido de manutenção. Nas mudas de Acaiá, não foi observada uma única tendência, enquanto que em plantas do tratamento controle houve aumento dos teores desse pigmento nas duas últimas avaliações, nas mudas sob deficiência de Mg, observou-se decréscimo seguido de aumento a cada 10 dias. Ao final do experimento, os teores de clorofila “b” foram, significativamente, menores 12% (Catuaí) e 51% (Acaiá) nas mudas deficientes em Mg, quando comparadas às controle (Gráfico 5B).

O papel do Mg como átomo central da molécula de clorofila é, talvez, a função mais conhecida do Mg e sua deficiência tem como sintoma característico clorose foliar, tipicamente internerval que, neste trabalho, tornou-se levemente aparente a partir do 20º dia após a imposição do tratamento deficiente em Mg. Resultados semelhantes foram encontrados por Hermans et al. (2005) em beterraba, Cakmak e Marschner (1992) em feijão e Esfandiari, Shokrpour e Alavi-Kia (2010) em trigo.

Com o início da deficiência em Mg, bem como encontrado por Hermans et al. (2004), houve um declínio nas concentrações de clorofila “b” que foi seguido pelo declínio de clorofila “a” (Gráficos 5A e 5B). Essa redução nas concentrações das clorofilas em plantas deficientes em Mg tem sido atribuída ao acúmulo de açúcares nas folhas (Gráficos 7A, 7B, 7C e 7D), mais do que à redução nos níveis de Mg (Gráfico 1) (CAKMAK; HENGELER; MARSCHNER, 1994b). Esses dois eventos observados em folhas podem estar envolvidos na regulação negativa de genes envolvidos na fotossíntese, como aqueles que codificam as proteínas de ligação à clorofila “a” e “b” (HERMANS et al., 2004).

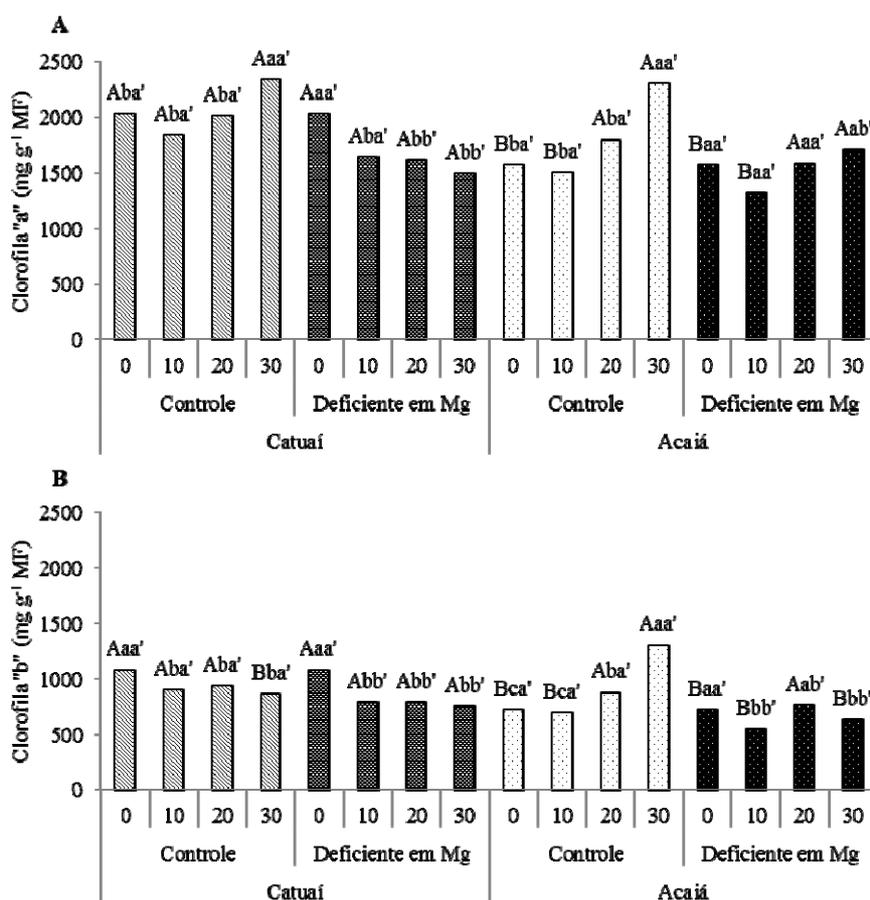


Gráfico 5 Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos foliares de clorofila "a" (A) e "b" (B) de mudas de café cultivares Catuaí e Acaíá

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofe o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

Os teores de carotenoides nas mudas de Catuaí decresceram com o tempo de experimento, notadamente aos 10 e 20 dias na ausência do Mg. Já nas mudas de Acaiá, deficientes em Mg, esse decréscimo ocorreu prematuramente, aos 10 dias e a partir daí, permaneceu constante. Ao final do período de avaliação os teores de carotenoides foram menores 33% (Catuaí) e 16% (Acaiá) nas mudas cultivadas na ausência de Mg, em comparação às testemunhas (Gráfico 6A).

Enquanto que a relação carotenoides/clorofilas não variou nas mudas de Catuaí, cultivadas sob deficiência de Mg, durante todo o período experimental, nas de Acaiá, foram observados decréscimos a partir dos 10 dias da deficiência desse nutriente. Dessa forma, ao final do experimento, para ambas as cultivares essa relação foi maior (14%: Catuaí e 27%: Acaiá) nas mudas cultivadas na ausência de Mg, quando comparadas às testemunhas (Gráfico 6B).

No que se diz respeito aos carotenoides, um significativo aumento, 14% (Catuaí) e 27% (Acaiá), na relação entre carotenoides e clorofilas em plantas deficientes em Mg (Gráfico 6B) pode ser uma resposta adaptativa ao aumento na geração de EROs (Gráfico 9A), uma vez que os carotenoides estão envolvidos na proteção das membranas fotossintéticas, por meio da remoção efetiva das EROs e do quenching não fotoquímico da clorofila excitada (PÉREZ-GÁLVEZ; MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2002).

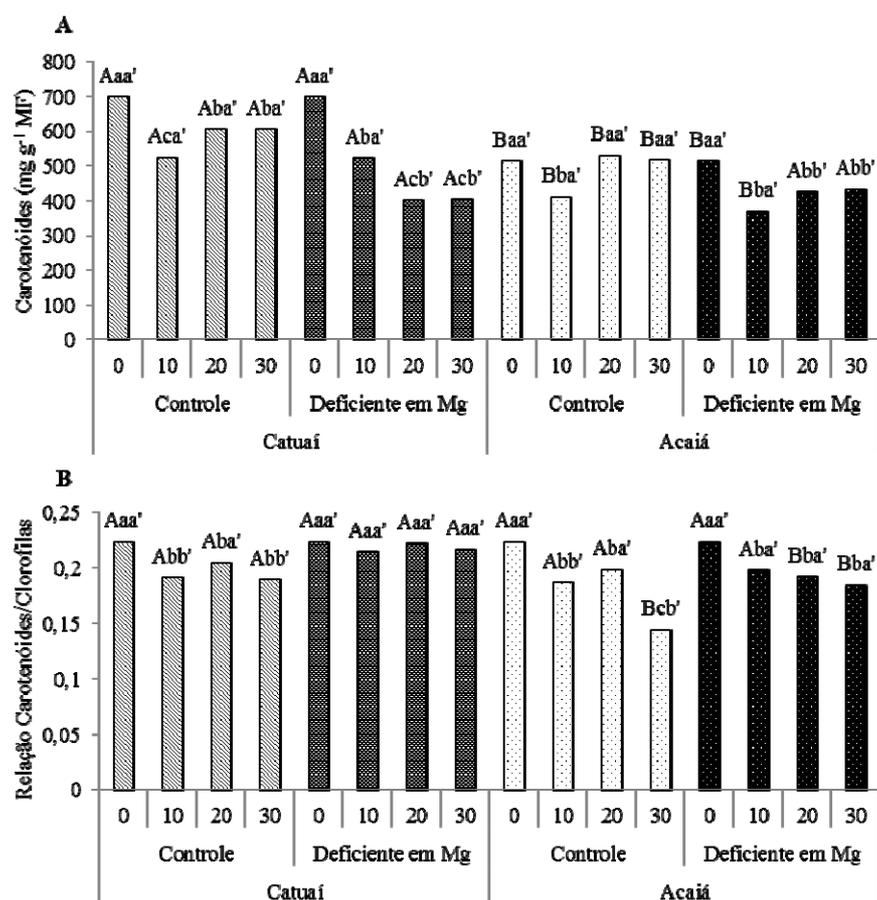


Gráfico 6 Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos foliares de carotenoides (A) e na relação carotenoides/clorofila (B) de mudas de café cultivares Catuaí e Acaí

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofe o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

4.4 Carboidratos

De maneira geral, os teores foliares de sacarose nas mudas de Catuaí e Acaiá, deficientes em Mg, foram maiores 23% e 29%, respectivamente, quando comparados àqueles verificados nas mudas onde os níveis desse nutriente estavam normais. Ao contrário do que aconteceu com as mudas controle de Catuaí e Acaiá, onde se observou uma queda nos teores desse carboidrato na segunda avaliação, nas mudas deficientes de Catuaí, essa queda não foi observada em nenhuma amostragem. No caso da Acaiá, houve um aumento entre a primeira e segunda amostragem de folhas (Gráfico 7A).

No que se refere aos teores de açúcares solúveis totais (AST), folhas de Catuaí e de Acaiá, deficientes em Mg, passaram a acumular esse carboidrato, relativamente ao controle, a partir dos 20 dias de imposição dos tratamentos. Esse padrão de acúmulo permitiu que mudas de cafeeiros deficientes, apresentassem maiores teores (44%: Catuaí e 33%: Acaiá) de AST que as do controle (Gráfico 7B).

Em relação aos teores de açúcares redutores (AR), folhas de Catuaí e de Acaiá, deficientes em Mg, passaram a acumular esse carboidrato, relativamente ao controle, a partir dos 10 dias de imposição dos tratamentos. Esse padrão de acúmulo permitiu que mudas de cafeeiros deficientes, apresentassem maiores teores (16% Catuaí e 89% Acaiá) de AR que as do controle (Gráfico 7C).

Quanto ao amido, persiste, ainda, a tendência observada para os outros carboidratos de se acumular na parte aérea, quando as mudas foram cultivadas na ausência de Mg. Percebe-se, claramente, que tanto nas mudas de Catuaí quanto de Acaiá deficientes desse nutriente, a partir dos 10 dias do início do experimento, o teor de amido passou a se diferenciar, estatisticamente, das mudas controle. Nessas últimas, os teores caíram com o tempo enquanto que nas deficientes, ele aumentou, chegando ao final do período experimental 96%

(Catuaí) e 46% (Acaiá) maiores em plantas deficientes quando comparadas às testemunhas (Gráfico 7D).

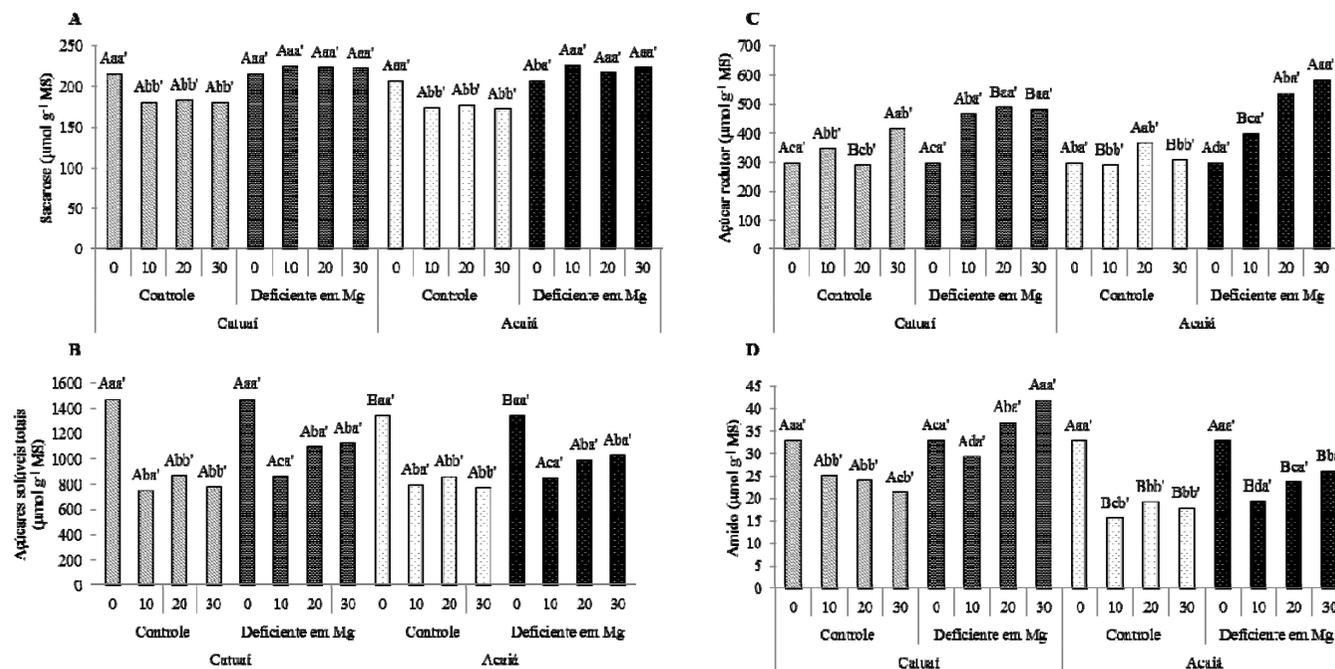


Gráfico 7 Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos foliares de sacarose (A), açúcares solúveis totais (B), açúcar redutor (C) e amido (D) de mudas de café cultivares Catuaí e Acaí

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofe o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

Nas raízes das mudas de Catuaí deficientes em Mg, observou-se um decréscimo, aproximadamente, linear nos teores de sacarose no decorrer do experimento. Já nas plantas do tratamento controle, o teor desse carboidrato oscilou entre uma e outra amostragem permanecendo, no entanto, no mesmo patamar entre a primeira e a última avaliação. Por outro lado, nas mudas de Acaiá deficientes, os teores de sacarose, também, foram reduzidos com o tempo. Os valores do conteúdo de sacarose nas raízes de Acaiá, a exemplo do que ocorreu com Catuaí, foram sempre maiores (60% Catuaí e 42% Acaiá) nas mudas controle do que nas deficientes em Mg (Gráfico 8A).

Em relação aos teores de AST (Gráfico 8B) e AR (Gráfico 8C), raízes controle de Catuaí e Acaiá sofreram pequenas flutuações ao longo do tempo, sem, no entanto, apresentar, de maneira geral, grandes variações entre as amostragens inicial e final. Já nas mudas deficientes, houve um decréscimo nos teores desses carboidratos ao longo do tempo, levando a observação de que plantas de ambas as cultivares, submetidas à deficiência de Mg, apresentaram menores teores de AST (24% Catuaí e 32% Acaiá) e AR (59% Catuaí e 72% Acaiá) nas raízes, quando comparadas às plantas controle.

Quanto ao amido, persiste, ainda, a tendência observada para os outros carboidratos de serem reduzidos nas raízes quando as mudas foram cultivadas na ausência de Mg. Esse padrão de redução permitiu que mudas de cafeeiros deficientes apresentassem menores teores (51% Catuaí e 35% Acaiá) de amido do que as do controle (Gráfico 8D).

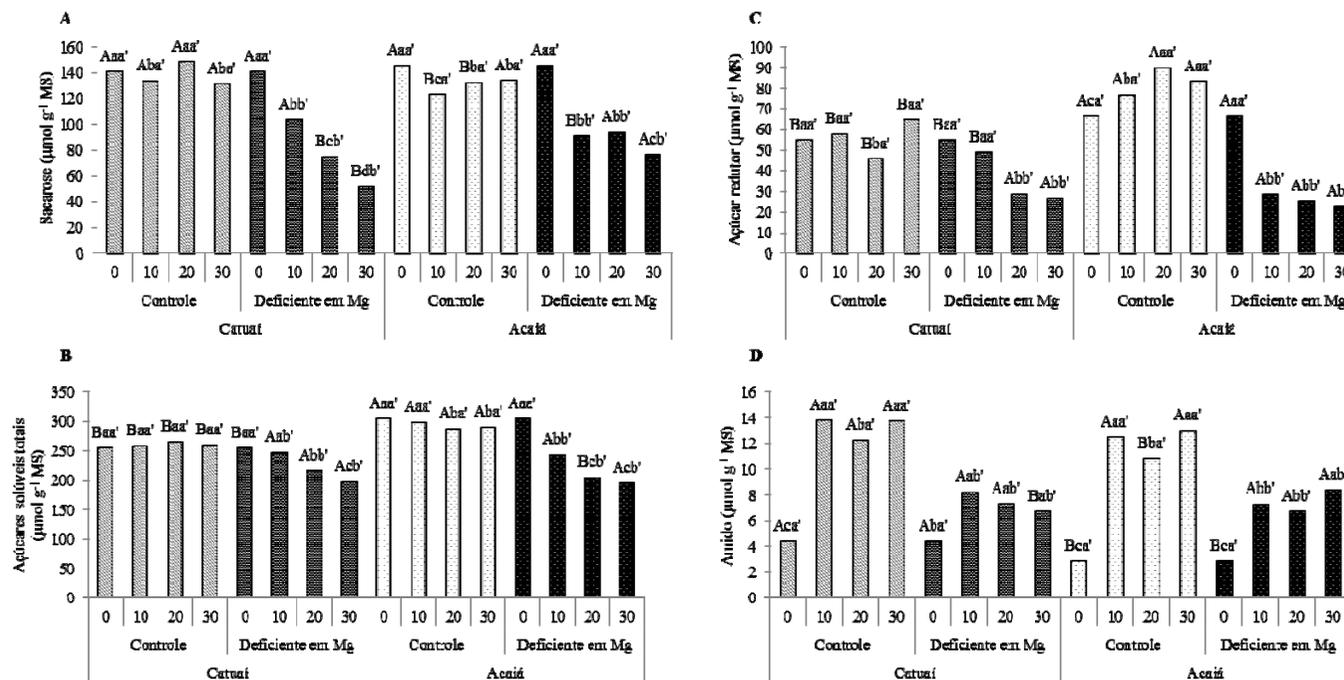


Gráfico 8 Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos radiculares de sacarose (A), açúcares solúveis totais (B), açúcar redutor (C) e amido (D) de mudas de café cultivares Catuaí e Acaíá

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofo o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

Cakmak, Hengeler e Marschner (1994b) observaram que existe uma clara relação entre a razão de massa seca parte aérea e raiz e a relativa distribuição de carboidratos entre elas. Nos resultados deste trabalho foram mostrados que as concentrações de carboidratos, dentre eles sacarose (Gráficos 7A e 8A), açúcares solúveis totais (Gráficos 7B e 8B), açúcares redutores (Gráficos 7C e 8C) e amido (Gráficos 7D e 8D) aumentaram nas folhas, enquanto que reduziram nas raízes de plantas deficientes em Mg. Isso significa que houve uma redução na proporção de fotossintatos translocados das folhas para as raízes de plantas deficientes em Mg, desencadeando um aumento na relação de massa seca entre a parte aérea e a raiz (Gráfico 4C).

A alteração no particionamento de fotossintatos não foi causada pela utilização preferencial do carbono fixado no crescimento da parte aérea em detrimento do crescimento da raiz, mas em razão do acúmulo de uma grande quantidade de carboidratos em folhas totalmente expandidas de plantas deficientes em Mg (Gráficos 7A, 7B, 7C e 7D). Tal fato, aliado à elevada relação de massa seca entre parte aérea e raiz (Gráfico 4C), sugere uma diminuição na exportação de fotossintatos das folhas para as raízes (CAKMAK; HENGELER; MARSCHNER, 1994a).

O acúmulo de amido em folhas de plantas deficientes em Mg (Gráfico 7D) é, presumidamente, um efeito direto da redução de exportação de sacarose, levando ao acúmulo de sacarose (Gráfico 7A) e facilitando o fluxo de carbono recém fixado em amido, exercendo um papel inibitório sobre as enzimas de síntese de sacarose (CAKMAK; HENGELER; MARSCHNER, 1994a, 1994b).

A redução na fotossíntese de folhas deficientes em Mg pode ser uma possível explicação para a deficiência da exportação de sacarose via floema. No entanto, esta possibilidade parece improvável, uma vez que a atividade fotossintética diminui somente em fases posteriores da deficiência em Mg (CAKMAK; KIRBY, 2008).

Peaslee e Moss (1966) relataram que uma diminuição na fotossíntese não é um indicador sensível da deficiência de Mg. Dessa forma, a explicação mais provável da redução na exportação de sacarose via floema, induzida pela deficiência em Mg, pode estar relacionada a um efeito direto do Mg sobre o processo de carregamento de sacarose via floema (CAKMAK; KIRBY, 2008).

A sensibilidade do carregamento de sacarose via floema a baixas concentrações de Mg foi confirmada pela rápida restauração na exportação de sacarose após o ressuprimento deste elemento a plantas deficientes. Verificou-se, ainda, que o aumento na exportação de sacarose não estava relacionado com a fotossíntese, uma vez que foi detectado em condições de presença e ausência de luz (CAKMAK; HENGELER; MARSCHNER, 1994a).

O carregamento de sacarose, via floema, é um processo ativo catalisado pelo co-transporte de H^+ e sacarose, que envolve um gradiente de prótons, por meio da membrana plasmática das células do floema. O gradiente de prótons necessário para o co-transporte de H^+ e sacarose é estabelecido por uma H^+ -ATPase, localizada na membrana plasmática das células de tubo crivado (BOUCHÉ-PILLON et al., 1994; WARD et al., 1998). O bom funcionamento da H^+ -ATPase (BUSH, 1989; GETZ; KLEIN, 1995) está relacionado ao Mg-ATP, que é o principal complexo de ATP em sistemas biológicos (IGAMBERDIEV; KLECZKOWSKI, 2003) Logo, é mais provável que uma queda na concentração de Mg-ATP nos locais de carregamento de floema seja a principal razão da inibição do transporte de sacarose das folhas deficientes em Mg (CAKMAK; KIRBY, 2008).

4.5 Metabolismo antioxidante

Mudas de Catuaí e Acaiá apresentaram aumento nos teores foliares de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ao longo do período experimental, quando cultivadas sob deficiência do elemento Mg e manutenção dos valores quando cultivadas na presença. Esses valores são superiores em mudas da cultivar Catuaí, quando comparados à Acaiá. Dessa forma, ao final do período experimental, foi observado um aumento nos teores de H_2O_2 (23%: Catuaí e 33%: Acaiá) em mudas cultivadas na ausência de Mg, quando comparadas às controle (Gráfico 9A).

Os teores de ascorbato, uma molécula antioxidante, acompanharam a tendência dos teores de peróxido de hidrogênio (Gráfico 9A), ou seja, aumentaram em resposta a uma maior produção de H_2O_2 em plantas cultivadas na ausência do elemento Mg. Assim sendo, ao final do período experimental, foi observado um aumento significativo nos teores de ascorbato (201%: Catuaí e 144%: Acaiá) em mudas cultivadas na ausência de Mg, quando comparadas às controle (Gráfico 9B).

E dessa forma, os teores de malondialdeído (MDA), também, acompanharam esse padrão observado nos teores de H_2O_2 (Gráfico 9A) e ascorbato (Gráfico 9B), ou seja, aumento ao longo do tempo em plantas cultivadas na ausência de Mg e manutenção em plantas cultivadas na presença. Foram encontrados valores superiores em mudas de a cultivar Catuaí, quando comparados à Acaiá. Ao final do período experimental, foi observado um aumento relevante nos teores de MDA (72%: Catuaí e 73%: Acaiá) em mudas cultivadas na ausência de Mg, quando comparadas às controle (Gráfico 9B). Essa elevação nos teores de MDA, um produto secundário do processo de peroxidação lipídica, é um resultado da remoção ineficiente do H_2O_2 pelo metabolismo antioxidante em condições de deficiência de Mg (Gráfico 9C).

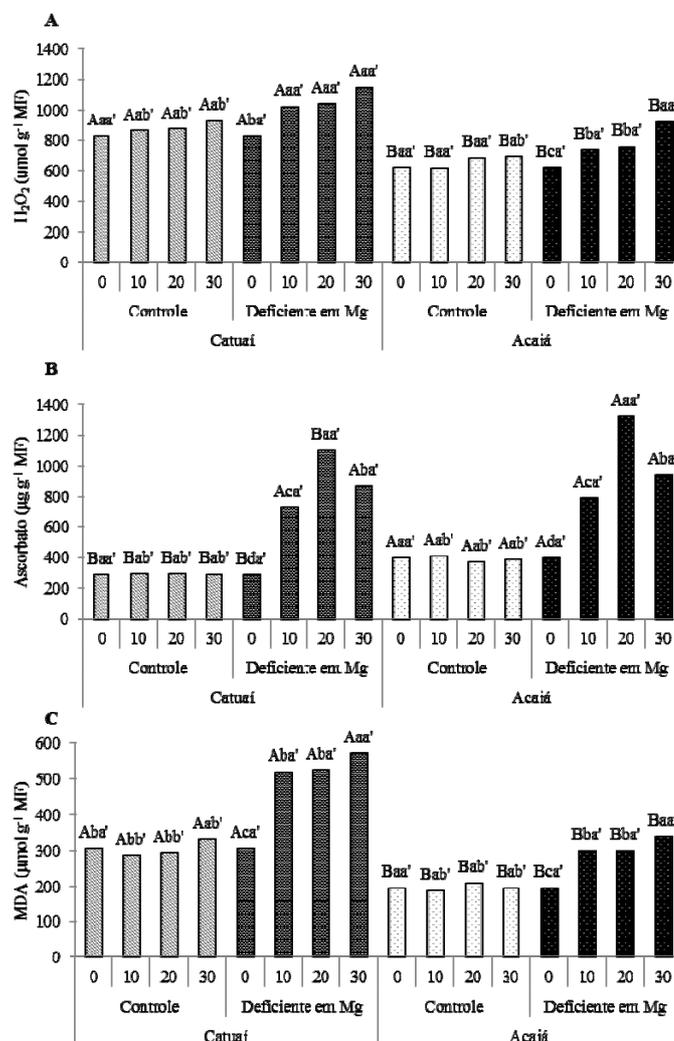


Gráfico 9 Efeitos da deficiência de Mg nos conteúdos foliares de peróxido de hidrogênio (A), ascorbato (B) e malondialdeído (C) de mudas de café cultivares Catuaí e Acaí

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofe o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

A atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) (Gráfico 10A), em folhas de ambas as cultivares, independentemente do tratamento, diminuiu nos primeiros 10 dias, aumentando em seguida ao longo do experimento. Entretanto, observa-se que os aumentos foram maiores (10%: Catuaí e 3%: Acaiá) nas mudas deficientes em Mg, quando comparadas às controle, sendo observados maiores valores em mudas de a cultivar Catuaí em detrimento da Acaiá.

Quanto às enzimas catalase (CAT) (Gráfico 10B) e peroxidase do ascorbato (APX) (Gráfico 10C), observa-se, claramente, que em mudas de Catuaí e Acaiá cultivadas na ausência de Mg, houve um aumento nas suas atividades nos primeiros dez dias de tratamento, permanecendo elevadas até o final do experimento. Desse modo, sob deficiência desse nutriente, a atividade das enzimas CAT e APX foram, significativamente, maiores (CAT – 69%: Catuaí e 22%: Acaiá; APX – 86%: Catuaí e 148%: Acaiá) do que aquelas observadas nas mudas controle.

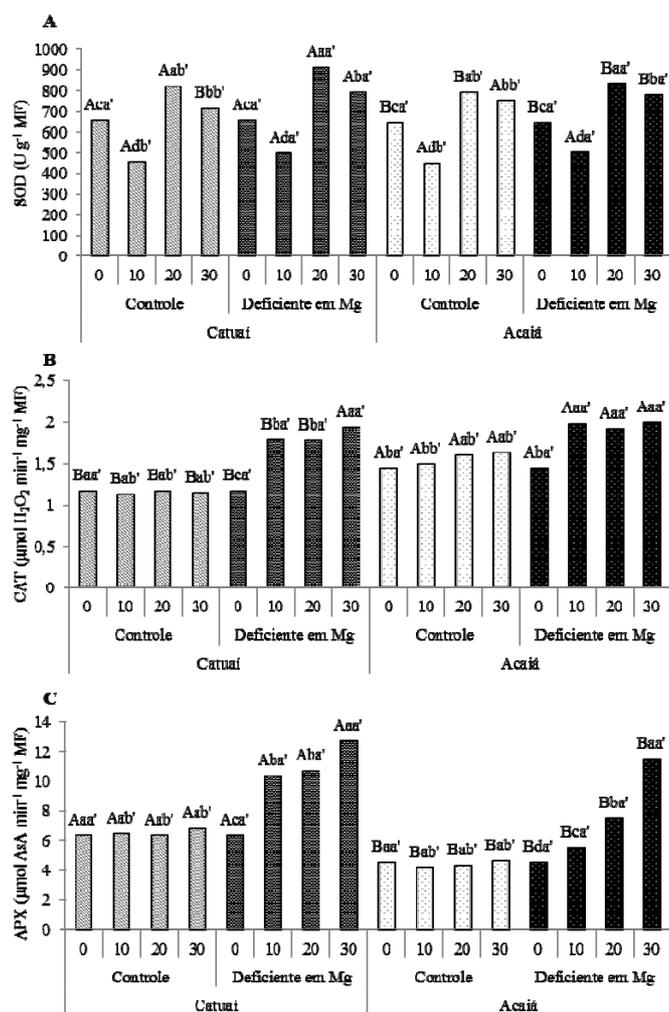


Gráfico 10 Efeitos da deficiência de Mg na atividade das enzimas dismutase do superóxido (A), catalase (B) e peroxidase do ascorbato (C) de mudas de café cultivares Catuaí e Acaí

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle e deficiente); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento em cada cultivar e letras minúsculas seguidas por apóstrofe o efeito da deficiência em Mg em cada tempo de coleta dentro de cada cultivar. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade.

O aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de plantas deficientes em Mg (Gráfico 9A) foi acompanhado pelo aumento na concentração de ascorbato (Gráfico 9B) e na atividade das enzimas SOD, CAT e APX (Gráficos 10A, 10B e 10C). Resultados semelhantes foram encontrados por Cakmak (1994) e Cakmak e Marschner (1992) em feijão, por Tewari, Kumar e Sharma (2006) em amora e por Candan e Tarhan (2003) em menta, em que houve ativação dos sistemas antioxidantes enzimático e não-enzimático em resposta à maior produção de EROs desencadeada pela deficiência em Mg.

Nas plantas de café estudadas, a maior atividade do sistema antioxidante nas folhas deficientes em Mg (Gráficos 9B, 10A, 10B e 10C) ocorreu antes de haver uma distinta redução nas concentrações de clorofilas (Gráficos 5A e 5B) e carotenoides (Gráficos 6A e 6B). Os elevados níveis de componentes do metabolismo antioxidante (Gráficos 9B, 10A, 10B e 10C), constituem uma resposta fisiológica inicial das plantas à deficiência em Mg (CAKMAK; MARSCHNER, 1992). Esta atuação precoce do sistema antioxidante, durante a deficiência de Mg, retarda os danos fotooxidativos causados pelas EROs e a inativação de enzimas fotossintéticas, fazendo com que a atividade fotossintética seja reduzida somente nas fases mais tardias do quadro de deficiência (KAISER, 1976).

A ativação do metabolismo antioxidante, em função da deficiência em Mg, é mais provável de ocorrer nos cloroplastos, onde há a fotoprodução de O_2^- e H_2O_2 , como um resultado do restrito consumo de potencial redutor na fixação de CO_2 . É, também, nessas organelas que a SOD (JACKSON, 1978) e as enzimas do ciclo de remoção do H_2O_2 (NAKANO; ASADA, 1981) estão predominantemente localizadas. No entanto, a atividade do metabolismo antioxidante não está limitada ao cloroplasto, ela, também, é importante para a

remoção de EROs em outros compartimentos celulares (CAKMAK, MARSCHNER, 1992).

A deficiência em Mg gera elevada formação de EROS, podendo levar a um desequilíbrio entre a produção de EROS e a remoção das mesmas pela atuação do sistema antioxidante, constituindo estresse oxidativo. Desta maneira, quando a produção de EROS está muito elevada em plantas deficientes em Mg, o aumento na concentração de moléculas antioxidantes e na atividade das enzimas do metabolismo antioxidante pode não oferecer proteção suficiente contra estas espécies. Nestes casos, estas espécies altamente reativas começam a atuar sobre as membranas celulares resultando em um aumento na peroxidação lipídica (CANDAN; TARHAN, 2003), conforme demonstrado pelos resultados em ambas as cultivares estudadas, pelo aumento de MDA, produto secundário desse dano oxidativo (Gráfico 9C).

5 CONCLUSÕES

A deficiência em Mg foi responsável por desencadear um acúmulo de carboidratos em folhas e uma redução nos seus conteúdos em raízes, desencadeando um aumento na relação de massa seca parte aérea e raiz.

Esse acúmulo de carboidratos nas folhas, desencadeou uma maior produção de EROs, bem como uma ativação do metabolismo antioxidante em mudas de cafeeiro de ambas as cultivares.

No entanto, a cultivar Catuaí apresentou uma atividade menos eficiente do metabolismo antioxidante na remoção das EROs, uma vez que apresentou maiores teores de MDA, um produto secundário do estresse oxidativo.

Assim sendo, a cultivar Catuaí é mais sensível à deficiência em Mg, uma vez que apresentou uma atividade ineficiente do metabolismo antioxidante na remoção das EROs, bem como uma redução no crescimento quando crescidas na ausência de Mg.

REFERÊNCIAS

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

ARAKAWA, N. et al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n. 5, p. 1289-1290, May 1981.

BARROS, R. S. et al. Determinação da área de folhas do café (*Coffea arabica* L. cv. "Bourbon Amarelo"). **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 20, n. 108, p. 44-52, mar. 1973.

BENNETT, W. F. **Nutrients deficiencies e toxicities in crop plants**. 2nd ed. Saint Paul: The American Phythopathological Society, 1997. 7 p.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 651-658, Feb. 1998.

BOUCHÉ-PILLON, S. et al. Immunolocalization of the plasma membrane H⁺-ATPase in minor veins of *Vicia faba* in relation to phloem loading. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 691-697, June 1994.

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

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 52, p. 302-310, Feb. 1978.

BUSH, D. R. Proton-couple sucrose transport in plasmalemma vesicles isolated from sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, p. 1318-1323, 1989.

CAKMAK, I.; HENGELER, C.; MARSCHENER, H. Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. **Journal Experimental of Botany**, Oxford, v. 45, p. 1251-1257, Sept. 1994a.

_____. Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, n. 278, p. 1245-1250, Sept. 1994b.

CAKMAK, I.; KIRBY, E. A. Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 133, p. 692-704, Aug. 2008.

CAKMAK, I.; MARSCHENER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 1222-1227, Apr. 1992.

CAKMAK, I.; YAZICI, A. M. Magnesium: a forgotten elemento in croop production. **Better Crops with Plant Food**, Norcross, v. 94, n. 2, p. 23-25, 2010.

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

CHOU, T. S. C. et al. Effect os magnesium deficiency on antioxidante status and cádmium toxicity in rice seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 168, p. 1021-1030, July 2011.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-520.

ESFANDIARI, E.; SHOKRPOUR, M.; ALAVI-KIA, S. Effect of Mg deficiency on antioxidante enzymes activities and lipid peroxidation. **Journal of Agricultural Science**, New York, v. 2, n. 3, p. 131-136, Sept. 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FISCHER, E. S. et al. Magnesium deficiency results in accumulation of carbohydrates and amino acids in source and sink leaves of spinach. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 102, n. 1, p. 16-20, Jan. 1998.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, Hoboken, v. 146, p. 359-388, Jan. 2000.

GERHARDT, R.; STITT, M.; HELDT, H. W. Subcellular metabolite levels in spinach leaves: regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partitioning. **Plant Physiology**, Rockville, v. 83, p. 399-407, July 1987.

GETZ, H. P.; KLEINS, M. The vacuolar ATPase of red beet storage tissue: electron microscopic demonstration of the "head-and-stalk" structure. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 108, n. 1, p. 14-23, 1995.

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

GOMIDE, M. B. et al. Comparação entre métodos de determinação de área foliar em cafeeiros Mundo Novo e Catuaí. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 118-123, dez. 1977.

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; SOUZA, C. A. S. **Cafeicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 317 p.

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

HERMANS, C. et al. Magnesium deficiency in sugar beet alters sugar partitioning and phloem loading in young mature leaves. **Planta**, New York, v. 220, p. 541-549, Feb. 2005.

_____. Physiological characterization of magnesium deficiency in sugar beet: acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II. **Planta**, New York, v. 220, p. 344-355, Sept. 2004.

HERMANS, C.; VERBRUGGEN, N. Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2153-2161, Aug. 2005.

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

IGAMBERDIEV, A. U.; KLECZKOWSKI, L. A. Membrane potential, adenylate levels and Mg^{+2} are interconnected via adenylate kinase equilibrium in plant cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1607, p. 111-119, Sept. 2003.

JACKSON, C. et al. Subcellular localization and identification of superoxide dismutase in leaves of higher plants. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 91, p. 339-344, Nov. 1978.

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

KAISER, M. W. The effect of hydrogen peroxide on CO_2 fixation of isolated chloroplast. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 440, p. 476-482, Sept. 1976.

KARABAL, E.; YÜCEL, M.; ÖKTEM, H. A. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. **Plant Science**, East Park Shannon, v. 164, p. 925-933, June 2003.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. et al. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. Davis: J. Wiley, 2001. p. F4.3.1-F4.3.8.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMIREZ, A.; HERRERA-ESTRELA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 280-287, June 2003.

MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 250-258, June 2009.

MALAVOLTA, E. **Nutrição mineral e adubação do cafeeiro**: colheitas econômicas máximas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1993. 210 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 201 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic, 1995. 285 p.

MARTINEZ, C. A. et al. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Science**, East Park Shannon, v. 160, p. 505-515, Feb. 2001.

MARTINEZ, H. E. P. et al. Faixas críticas de concentrações de nutrientes e avaliação do estado nutricional de cafeeiros em quatro regiões de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 703-713, jun. 2003.

_____. **Nutrição mineral, fertilidade do solo e produtividade do cafeeiro nas regiões de Patrocínio, Manhuaçu, Viçosa, São Sebastião do Paraíso e Guaxupé**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2004. 60 p. (Boletim Técnico, 72).

MILLER, G. L. Use dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Ames, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

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

PEASLEE, D. E.; MOSS, D. N. Photosynthesis in K- and Mg-deficient maize leaves. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 30, n. 2, p. 220-223, Mar. 1966.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Degradation of non-esterified and esterified xanthophylls by free radicals. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, n. 1569, p. 31-34, Jan. 2002.

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

RIGA, P.; ANZA, M. Effect of magnesium deficiency on pepper growth parameters: implications for the determination of Mg-critical value. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 26, p. 1581-1593, July 2003.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Maldev, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SUGIYANA, N.; NAKAYAMA, N.; AKAZAWA, T. Activation of spinach leaf ribulose-1,5-diphosphate carboxylase activities by magnesium ions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 30, p. 118-123, Jan. 1968.

SUN, O. J.; PAYN, T. W. Magnesium nutrition and photosynthesis in *Pinus radiata*: clonal variation and influence of potassium. **Tree Physiology**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 535-540, July 1999.

TERRY, N.; ULRICH, A. Effects of magnesium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. **Plant Physiology**, Rockville, v. 54, p. 379-381, Apr. 1974.

TEWARI, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P. N. Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidante responses in mulberry plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 7-14, Mar. 2006.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, East Park Shannon, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.

WARD, J. M. et al. Sucrose transport in higher plants. **International Review of Cytology**, New York, v. 178, n. 1, p. 41-71, 1998.

WEILL, M. de A. M. **Avaliação de fatores edafoclimáticos e de manejo na produção de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) na região de Marília e Garça, SP.** Piracicaba: ESALQ, 1990. 182 p.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets: iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, Hoboken, v. 182, p. 49-84, Apr. 2009.

YANG, G. et al. Physiological impacts og magnesium-deficiency in citrus seedlings: photosynthesis, antioxidante system and carbohydrates. **Trees**, Berlin, v. 26, p. 1237-1250, Feb. 2012.