

PAULO CESAR DIAS

**VARIAÇÃO ESPACIAL DA FOTOSÍNTESE E DE MECANISMOS DE
FOTOPROTEÇÃO NO CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

D541v
2006

Dias, Paulo Cesar, 1980-

Variação espacial da fotossíntese e de mecanismos de fotoproteção no cafeeiro (*Coffea arabica* L.) / Paulo Cesar Dias. – Viçosa : UFV, 2006.
xiii, 34f. : il. ; 29cm.

Orientador: Fábio Murilo da Matta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 29-34.

1. Café - Fotossíntese. 2. Café - Efeito da radiação solar. 3. Luz - Efeito fisiológico. 4. Fotoquímica.
5. *Coffea arabica*. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 572.462393

PAULO CESAR DIAS

**VARIAÇÃO ESPACIAL DA FOTOSÍNTESE E DE MECANISMOS DE
FOTOPROTEÇÃO NO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 16 de fevereiro de 2006

Prof^o Marcelo Ehlers Loureiro
(Conselheiro)

Prof^o Marco Aurélio Pedron e Silva

Prof^o Raimundo Santos Barros

Dr. Jailson Lopes Cruz

Prof^o Fábio Murilo DaMatta
(Orientador)

Aos meus pais, Ildefonso e Cecília,

*Pela presença constante, pelo apoio incondicional,
pelo Amor, pela dedicação, por tudo...*

*Aos meus irmãos, Maristela, Deusdete, Fonsinho, Jair,
Joel, Ana, João, Rosária (in memoriam), Rosa e
José Lúcio*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não ter me dado nada do que pedi, mas tudo de que precisava.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal e ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, por parte dos recursos fornecidos despendidos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Fábio Murilo DaMatta, pela orientação, amizade e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais (Cecília e Ildefonso), irmãos [Maristela, Deusdete, Fonsinho, Jair, Joel, Ana, João, Rosária (*in memoriam*), Rosa e José Lúcio], sobrinhos (Zeca, Fabrício, Jovane, Luana, Jamila, Patrícia, Camila, Bruna, João Vítor, Diego), pelo suporte familiar.

A Daiane, pois, mesmo à distância, faz-me viver a vida de forma mais feliz.

Aos inesquecíveis amigos, Carlos Eduardo e Welison, pela boa convivência e muitas gargalhadas na República “Acima da Perfeição”.

Ao grande amigo Marcio, companheiro de curso, e Rafael, que, juntos, compõem a República “Anexa à Acima da Perfeição”.

A Bruno, Aldo e Flávia, pela amizade e aconselhamentos no início do curso.

Aos professores conselheiros Marcelo Ehlers Loureiro e Marília Contim Ventrella, por todo auxílio prestado.

Aos professores Marco Aurélio Pedron e Silva e Raimundo Santos Barros, e ao Dr. Jaílson Lopes Cruz, pela participação na banca examinadora.

A todos professores do curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos, amizade e paciência.

Aos amigos e companheiros do Grupo Café: Wagner, Gustavo, Ângela, Roberto, Agnaldo, Karine, Marcelo, Paulo Cezar (PC II), Elaine Celin, Marco Túlio, Samuel, Cláudio e Hugo, pela colaboração e participação nas diversas etapas do desenvolvimento deste trabalho, fazendo com que a rotina se tornasse, quase sempre, divertida e prazerosa.

Aos amigos e colegas da Fisiologia: Ana Maria, Elaine, Werner, Carol, Gabriela, Rafaela, Dimas, Maurício, Vânia, Rita, Alexandra, Ricardo, Felipe, Franciele, Daniela,

Franciscleudo, Adriano, Camilo, Mercês, Geraldo (Marreco), Carlos Raimundo, Zé Maria, Zé Antônio, Osvaldo, Reginaldo e Toninho.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a conclusão de mais esta etapa.

BIOGRAFIA

PAULO CESAR DIAS, filho de Ildefonso Dias e Cecília Carlete Dias, nasceu no dia 04 de abril de 1980, em Alegre, Estado do Espírito Santo.

Concluiu o ensino básico no ano de 1997, na escola de 1º e 2º Graus “Arquimimo Mattos”, em Piaçu, ES.

Em abril de 1999, iniciou o curso de Agronomia, na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), colando grau em 29 de novembro de 2003. Durante a graduação, exerceu a função de monitor de algumas disciplinas, dentre elas, Fisiologia Vegetal. Participou também do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq), na linha de pesquisa de Germinação de Sementes de Espécies Florestais, pela Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES).

Em março de 2004, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG, na linha de pesquisa Fotossíntese e Produtividade em Plantas Tropicais e Subtropicais, submetendo-se à defesa de tese em 16 de fevereiro de 2006.

LISTA DE ABREVIATURAS

- A = taxa de assimilação líquida de carbono
- APX = peroxidase do ascorbato
- CAT = catalase
- C_i/C_a = razão entre as concentrações interna e ambiente de CO_2
- ERO's = espécies reativas de oxigênio
- F_0 = fluorescência inicial
- F_0' = F_0 adaptada à luz
- F_m = fluorescência máxima
- F_m' = fluorescência máxima da amostra à luz
- F_s = fluorescência constante
- FS = fotossistema
- F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do FSII
- F_v'/F_m' = eficiência na captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII
- GPX = peroxidase da glutathione
- g_s = condutância estomática
- I_c = irradiância de compensação
- I_s = irradiância de saturação
- MDA = aldeído malônico
- N = nitrogênio
- NPQ = coeficiente de extinção não-fotoquímica
- P_E = fração da irradiância não utilizada na fase fotoquímica do FSII e nem dissipada termicamente
- PQ = paraquat
- q_p = coeficiente de extinção fotoquímica
- RFA = radiação fotossinteticamente ativa
- RFA_i = RFA efetivamente interceptada pela folha

- SOD = dismutase do superóxido
- T_{amb} = temperatura ambiente
- T_f = temperatura foliar
- TTE = taxa de transporte de elétrons
- δe = déficit de pressão de vapor entre o interior da folha e a atmosfera
- Φ_{FSII} = rendimento quântico fotoquímico do FSII

CONTEÚDO

Resumo	x
Abstract	xii
1.0 - Introdução	1
2.0 - Material e Métodos	5
2.1 - Parâmetros agrometeorológicos, radiação fotossinteticamente ativa interceptada pela folha, temperatura foliar e inclinação foliar.....	5
2.2 - Trocas gasosas.....	6
2.3 - Parâmetros de fluorescência.....	6
2.4 - Pigmentos.....	7
2.5 - Nitrogênio total.....	7
2.6 - Estresse oxidativo induzido por Paraquat	7
2.7 - Atividades enzimáticas.....	8
2.8 - Peróxido de hidrogênio e danos celulares.....	8
2.9 - Estatística.....	8
3.0 - Resultados	10
3.1 - Ambiente.....	10
3.2 - Trocas gasosas e ângulo foliar.....	11
3.3 - Respostas fotossintéticas à radiação fotossinteticamente ativa.....	12
3.4 - Fotoinibição e fluorescência da clorofila <i>a</i>	13
3.5 - Utilização da radiação fotossinteticamente ativa em processos fotoquímicos e não-fotoquímicos.....	16
3.6 - Clorofilas, carotenóides e nitrogênio total.....	17

3.7 - Atividades enzimáticas.....	18
3.8 - Peróxido de hidrogênio e danos celulares.....	19
3.9 - Estresse oxidativo induzido por Paraquat	19
4.0 - Discussão.....	22
5.0 - Conclusões.....	28
6.0 - Referências Bibliográficas.....	29

RESUMO

DIAS, Paulo Cesar, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Variação espacial da fotossíntese e de mecanismos de fotoproteção no cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Orientador: Fábio Murilo DaMatta. Conselheiros: Marcelo Ehlers Loureiro e Marília Contim Ventrella.

O comportamento das trocas gasosas, dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e do sistema antioxidativo foi estudado em plantas adultas de café arábica cultivadas em campo e orientadas no sentido norte-sul, em Viçosa-MG, objetivando-se identificar potenciais mecanismos de fotoproteção e avaliar como tais mecanismos se ajustariam espacial e diurnamente. Para isso, procederam-se às avaliações em diferentes posições da copa, em agosto de 2005, época relativamente fria, seca e com alta insolação, na qual o cafeeiro exibe taxas muito baixas de fotossíntese. As baixas taxas fotossintéticas foram largamente resultantes de limitações não-estomáticas. Isso, aliado à elevada interceptação da radiação solar, particularmente pelas folhas da face oeste à tarde, traduziu-se numa discreta fotoinibição crônica da fotossíntese. De modo geral, menores valores do rendimento quântico fotoquímico do fotossistema II (Φ_{FSII}) foram acompanhados por incrementos paralelos no coeficiente de extinção não-fotoquímica, indicando aumento na capacidade de dissipação de calor. Ademais, a taxa de transporte aparente de elétrons aumentou, à tarde, nas folhas da face oeste, fato largamente associado à elevada irradiância interceptada por aquelas folhas, a despeito dos decréscimos observados em Φ_{FSII} e no coeficiente de extinção fotoquímica. Como consequência, uma maior pressão de excitação ocorreu nas folhas da face oeste, resultando no aumento da proporção de energia não utilizada na fase fotoquímica e nem dissipada termicamente. De modo geral, as folhas do cafeeiro, independentemente de faces ou estratos, apresentaram capacidade similar de dissipação da radiação fotossinteticamente ativa em processos fotoquímicos e não-fotoquímicos. Isso sugere que o cafeeiro pode dissipar, de forma aparentemente satisfatória, o excesso da energia absorvida, apresentando capacidade de resposta plástica de sua maquinaria fotossintética às variações da irradiância. Maiores ângulos foliares mostraram-se relacionados à maior interceptação de luz pelas folhas dos estratos superiores, principalmente na face oeste da copa. A concentração de clorofilas e carotenóides

foi maior em folhas dos estratos inferiores, mas não houve nenhuma alteração na razão clorofila *a*/clorofila *b*. As atividades da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT) e da peroxidase do ascorbato (APX), foram, de modo geral, semelhantes nas folhas, independentemente de estratos e faces. Somente uma maior atividade de SOD em folhas dos estratos superiores foi observada, fato que pode estar associado a maior acúmulo de peróxido de hidrogênio nas folhas daqueles estratos, independentemente de faces. Poucas foram as diferenças nas atividades da SOD, da CAT, da APX e da peroxidase da glutatona entre folhas das diferentes faces e estratos, quando se induziu o estresse oxidativo com Paraquat, mas uma maior redução da eficiência fotoquímica nas folhas dos estratos da face oeste foi observada, à semelhança do que ocorreu em condições de campo. Apesar de as folhas localizadas na face oeste da copa estarem submetidas a um maior estresse luminoso e, portanto, sujeitas de forma mais marcante ao estresse oxidativo, não houve danos celulares consideráveis, estimados pelo acúmulo de aldeído malônico. Uma vez que a atividade das enzimas estudadas foi muito similar, independentemente da posição na copa, sugere-se que outros sistemas de fotoproteção possam ter maior importância na proteção da maquinaria fotossintética, particularmente nas folhas da face oeste quando expostas à elevada irradiância.

ABSTRACT

DIAS, Paulo Cesar, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Photosynthesis and photoprotection mechanisms vary spacially in coffee (*Coffea arabica* L.).** Adviser: Fábio Murilo DaMatta. Committee members: Marcelo Ehlers Loureiro and Marília Contim Ventrella

This study aimed to identify potential photoprotective mechanisms and how they could be spatially and diurnally adjusted. It was conducted in an arabica coffee tree plantation (north-south-oriented hedgerows) in Viçosa, Southeastern Brazil. Gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, and antioxidant system were examined throughout. Evaluations were performed in different canopy positions in August 2005 (dry, cold season with high insolation) when the net photosynthetic rate (*A*) of coffee tree is very low. This low *A* largely resulted from non-stomatal limitations. This, associated with an elevated interception of solar radiation, led to a discrete chronic photoinhibition of photosynthesis at noon, particularly in west-faced leaves. In a general way, decreased quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}) paralleled an increased non-photochemical quenching, indicating a rise in heat dissipation. Apparent electron transport rate also rose during afternoon in west-faced leaves, that was largely a consequence from increased irradiance interception by those leaves, although decreases in both Φ_{PSII} and photochemical quenching coefficient were observed. As a result, a higher excitation pressure should have occurred in west-faced leaves, thus leading to an increased fraction of irradiance neither used in photochemistry nor dissipated thermally. Regardless of their positions, coffee leaves showed similar ability for energy dissipation into photochemical and non-photochemical processes. This suggests that the plant might dissipate satisfactorily the excess of absorbed light, *i.e.* the coffee tree might plastically adjust its photosynthetic machinery to changing irradiance. Steeper leaf angles were related to greater irradiance interception in the upper stratum leaves, particularly in the west side. Chlorophyll and carotenoid concentrations were higher in lower stratum leaves. There was no change in chlorophyll *a/b* ratio, regardless of the treatments. Activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX) generally were similar among different sampled leaves. However, a greater SOD activity was found in upper stratum leaves that could be associated with a larger

hydrogen peroxide concentration in those leaves. Little, if any, differences in the activities of SOD, CAT, APX and glutathione peroxidase were observed in paraquat-treated leaves. A stronger decrease in the maximum efficiency of photosystem II was registered in paraquat-treated west-faced leaves, similarly to what occurred in the field. Despite west-faced leaves being naturally submitted to a high-light stress, malondialdehyde accumulated in a similar way as in the leaves from other canopy positions. Since the activity of antioxidant enzymes was similar irrespective of leaf position, some other photoprotecting systems should also be of utmost importance for protection of the photosynthetic machinery, particularly in west-faced leaves when exposed to bright irradiance.

1.0 - INTRODUÇÃO

No gênero *Coffea* existem, aproximadamente, 100 espécies, dentre as quais, apenas duas apresentam significância econômica no mercado mundial de café: *C. arabica* L. (café Arábica) e *C. canephora* Pierre ex Froehner (café Robusta). O café é a mercadoria mais importante do comércio mundial de produtos agropecuários, representando uma fonte importante de renda para vários países da América Latina, África e Ásia (DaMatta, 2004a). Atualmente, o café arábica responde por, aproximadamente, dois terços do café produzido mundialmente, e o café Robusta, pelo restante.

Originário da África, onde é encontrado como vegetação de sub-bosque e, portanto, em ambientes sombreados, o café expandiu-se e adaptou-se às mais variadas condições ecológicas, de forma que cultivos a pleno sol produzem satisfatoriamente e, na maioria das vezes, mais que os plantios à sombra (DaMatta, 2004b). No Brasil, o café é plantado desde o Paraná até Rondônia, em altitudes que variam de poucos metros até mais de 1000 m. Em decorrência disso, as condições climáticas às quais a cultura é submetida variam amplamente. No sudeste do Brasil, em regiões com altitudes elevadas, é comum a ocorrência, por exemplo, de temperaturas relativamente baixas no inverno (DaMatta et al., 1997; DaMatta & Maestri, 1997), fato que pode acarretar decréscimos substanciais tanto no crescimento vegetativo como na fotossíntese (Silva et al., 2004)

Plantas cultivadas em condições de baixa temperatura podem apresentar diversas modificações nos diferentes componentes da maquinaria fotossintética, incluindo redução da abertura estomática (Fryer et al., 1995; Scharberg et al., 1995; Peña-Valdivia et al., 1994), danos às membranas fotossintéticas (O'kane et al., 1996; Hayden & Baker, 1990), alterações na cinética da fluorescência da clorofila *a* (Martínez-Ferri et al., 2004; Haldimann et al., 1996; Lovelock & Winter, 1996; Fryer et al., 1995; Schaberg et al., 1995), alteração da atividade de enzimas fotossintéticas (Schaberg et al., 1995) e aumento da resistência mesofílica (Ferris et al., 1996; Kumar & Tieszen, 1980). Assim, em virtude de um longo tempo de exposição a baixas temperaturas, algumas dessas alterações, combinadas ou não, podem acarretar, como consequência final, a redução da taxa fotossintética. Isto, por seu turno, reduz a irradiância de saturação (I_s) (Martínez-Ferri et al., 2004) e, especialmente em dias claros de inverno, quando a

irradiância excede a capacidade de utilização da luz na fotossíntese, a fotoinibição da fotossíntese pode ocorrer (Bertamini & Nedunchezian, 2003; Barth et al., 2001). A fotoinibição é manifestada por uma queda na eficiência fotoquímica do fotossistema (FS) II (Pandey et al., 2005), que pode ser avaliada pela razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m) da clorofila *a* (Krause & Weis, 1991). Essa razão pode ser usada como um indicador sensível do desempenho fotossintético das plantas (Maxwell & Johnson, 2000), com valores ótimos em torno de 0,80 - 0,83, medidos em várias espécies vegetais (Björkman & Demmig, 1987).

Decréscimos em F_v/F_m podem ser atribuídos a, pelo menos, dois processos (Osmond, 1994). O primeiro, denominado de fotoinibição dinâmica, é rapidamente reversível (Long et al., 1994; Osmond, 1994; Demmig-Adams & Adams, 1992), sendo parcialmente associado a mecanismos de regulação intrínsecos ao FSII (Eggert et al., 2003; Krause & Weis, 1991), particularmente os eventos que envolvem a desepoxidação da violaxantina a zeaxantina (Eggert et al., 2003; Demmig-Adams & Adams, 1992). O segundo processo, denominado de fotoinibição crônica, é associado à manutenção de lenta reversibilidade dos mecanismos dissipadores de energia (Martínez-Ferri et al., 2004; Ishida et al., 1999), a processos reparatórios ou a danos permanentes na maquinaria fotoquímica (Osmond, 1994). A fotoinibição dinâmica deve ser considerada como a capacidade de as plantas ajustarem-se fotossinteticamente às condições ambientes prevalentes, e não implicaria em danos à maquinaria fotossintética (Hurner et al., 1996). Porém, a inativação dos centros de reação do FSII, via ocorrência de danos à proteína D_1 do centro de reação do FSII, pode também agir na dissipação efetiva de energia (Long et al., 1994). Contudo, a fotoinibição dinâmica e a fotoinibição crônica são processos co-ocorrentes e suas contribuições respectivas dependem da extensão do excesso de fótons durante a exposição à luz (Russell et al., 1995). A proporção relativa de cada um desses processos pode ser determinada seguindo-se as respostas de recuperação de F_v/F_m de tecidos foliares adaptados ao escuro (Eggert et al., 2003; Krause & Weis, 1991). O primeiro estágio de recuperação de F_v/F_m é rapidamente reversível, com duração menor que 1 h (Ishida et al., 1999; Thiele et al., 1996), envolvendo a epoxidação da zeaxantina (Eggert et al., 2003). A recuperação em um segundo estágio envolve a degradação e síntese 'de novo' da proteína D_1 (Eggert et al., 2003), com duração superior a 1 h (Ishida et al., 1999; Thiele et al., 1996).

A ocorrência de fotoinibição crônica pode ser analisada via medição da razão F_v/F_m na antemanhã (Ishida et al., 1999). Decréscimos nessa razão durante o inverno têm sido associados com o aumento na dissipação térmica de energia radiante, estando ainda relacionados com a retenção de elevadas concentrações de componentes desepoxidados do ciclo das xantofilas (zeaxantina e anteraxantina) (García-Plazaola et al., 1999; Björkman & Demmig-Adams, 1995),

que protegeriam, assim, o FSII de sobre-excitação e de fotodanos (Gilmore, 1997). Alternativamente, reduções sustentadas de F_v/F_m podem também resultar de acúmulo de centros de reação não-funcionais do FSII e de fotoinativação parcial do FSII (Niyogi, 1999; García-Plazaola et al., 1997). Esses últimos processos também conduzem à dissipação do excesso de fótons como calor, mas, em última análise, resultariam em fotodanos após exposição prolongada dos tecidos foliares a irradiâncias excessivas (Long et al., 1994).

Uma vez que, via de regra, as limitações à assimilação do CO₂ precedem a inativação das reações de transferência de elétrons, a combinação de baixas temperaturas com elevadas irradiâncias pode, então, sobre-excitar os transportadores de elétrons no cloroplasto, podendo, assim, exacerbar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) nos cloroplastos (García-Plazaola et al., 1999). Dentre tais ERO's, destacam-se o radical superóxido (O₂^{·-}), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical hidroxil (OH[·]) e o oxigênio singlete (¹O₂), que seriam produtos inevitáveis do metabolismo celular (Yu & Rengel, 1999). Tais compostos são potencialmente capazes de resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Asada, 1999; Smirnoff, 1995), incluindo a peroxidação de lipídios (Lima et al., 2002; Mascher et al., 2002), a desnaturação de proteínas e a mutação do DNA (Mascher et al., 2002; Asada, 1999). Além disso, a peroxidação de lipídios de membrana pode resultar na perda de compartimentalização celular (Lima et al., 2002; Asada, 1999).

Em plantas, o herbicida Paraquat (PQ) incrementa o estresse oxidativo diretamente, gerando radicais livres. Em nível de FSI, PQ é fotorreduzido e, subseqüentemente, reoxidado pela transferência de um elétron ao oxigênio, formando o radical superóxido (Rabinowitch et al., 1983). Radicais hidroxilas e outros radicais produzidos a partir do superóxido, e o próprio superóxido, podem provocar danos celulares severos (Babbs et al., 1989). Várias evidências indicam que os mecanismos de tolerância a determinados estresses podem estar associados, também, com a tolerância ao estresse oxidativo (Smirnoff et al., 1995), como o ocasionado por PQ.

Para proteção da maquinaria fotossintética contra estresses oxidativos, as plantas precisam dissipar o excesso de energia luminosa, o que pode ser alcançado mediante a regulação da eficiência fotoquímica via ciclo das xantofilas (Demmig-Adams et al., 1996), por manutenção do fluxo de elétrons envolvendo rotas alternativas, como a fotorrespiração (Ort & Baker, 2002) e a reação de Mehler (Osório, 2006; Apel & Hirt, 2004; Asada, 1999) ou, ainda, por atuação do sistema de defesa antioxidativo (Apel & Hirt, 2004; Asada, 1999). Tal sistema compreende mecanismos enzimáticos, composto pelas chamadas “enzimas antioxidantes” (*e.g.*, dismutase do superóxido, SOD; catalase, CAT; peroxidase do ascorbato, APX; peroxidase da glutatona, GPX), além da participação de moléculas antioxidantes de

pequeno peso molecular, como o ascorbato, a glutathiona reduzida e o α -tocoferol (Ort & Baker, 2002; Asada, 1999; Noctor & Foyer, 1998). Maior proteção contra excesso de irradiância pode também ocorrer via alteração do ângulo de inserção foliar, uma vez que, quanto mais verticalizada estiver a folha, menor será a interceptação da radiação incidente nas horas de maior elevação solar (DaMatta, 2003).

Espécies comerciais de café são susceptíveis à injúria por baixas temperaturas, provavelmente pelo fato de o café ser originário do Continente Africano, onde as temperaturas são relativamente elevadas, mesmo no inverno. Em café, são poucos os estudos associando efeitos fisiológicos a temperaturas moderadamente baixas (DaMatta et al., 1997; Bauer et al., 1985; Kumar & Tieszen, 1980), especialmente baixas temperaturas noturnas seguidas de dias ensolarados, como normalmente ocorre durante o inverno na Zona da Mata mineira e no sul de Minas Gerais. Nessas regiões, é comum o plantio de café em linhas com sentido norte-sul, dependendo da topografia do terreno. Esse tipo de orientação faz aumentar a interceptação de radiação solar na face oeste, particularmente à tarde, período em que a taxa fotossintética é, normalmente, extremamente reduzida (Chaves, 2005), concorrendo, pois, para exacerbar a fotoinibição da fotossíntese naquela face. Desse modo, folhas localizadas nos estratos superiores, especialmente na face oeste da copa, por estarem constantemente expostas a um maior nível de estresse lumínico, devem ajustar-se a tal condição, desenvolvendo mecanismos de proteção, *e.g.*, maior dissipação não-fotoquímica de energia e menor interceptação de luz. Neste estudo, portanto, examinaram-se as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a*, o sistema enzimático antioxidante e danos celulares, bem como a tolerância potencial de tecidos foliares ao estresse oxidativo artificialmente induzido por Paraquat. O objetivo deste trabalho foi, pois, identificar potenciais mecanismos de fotoproteção, bem como avaliar como tais mecanismos se ajustam espacial e diurnamente, em café arábica. Para tanto, procederam-se às avaliações em diferentes posições da copa, em agosto de 2005, época relativamente fria, seca e com alta insolação, na qual o cafeeiro exhibe taxas muito baixas de fotossíntese.

2.0 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em um campo experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 m de altitude), Minas Gerais. A região possui clima subtropical, com temperatura média anual de 19°C. A precipitação média anual é de 1200 mm, com uma estação seca pronunciada coincidindo com os meses mais frios (abril a setembro). Nesse período, são comuns noites frias (temperaturas mínimas variando, tipicamente, de 5 a 12°C) seguidas de dias ensolarados (mais de 9 h de insolação), com temperaturas máximas facilmente excedendo 25°C (Chaves, 2005).

Foram utilizadas plantas de café (*C. arabica* L. cv Catuaí Vermelho IAC 44), com 18 anos de idade. As plantas vêm sendo cultivadas a pleno sol, sob espaçamento de 3,0 x 1,0 m, com uma planta por cova, e fileiras orientadas no sentido norte-sul. O cafezal foi renovado, por meio de recepa, em 1996. As avaliações e amostragens foram realizadas em agosto de 2005. Houve precipitação abundante nos dias precedentes às medições. Avaliaram-se folhas completamente expandidas, do terceiro ou quarto par, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, situados nas faces leste e oeste das plantas, utilizando-se de folhas dos estratos superior e inferior do dossel. Tecidos foliares foram amostrados em torno do meio-dia, congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a -80°C até serem analisados.

Avaliaram-se os seguintes parâmetros:

2.1 - *Parâmetros agrometeorológicos, radiação fotossinteticamente ativa interceptada pela folha, temperatura foliar e inclinação foliar*

As temperaturas máxima e mínima foram medidas nos dias das avaliações, utilizando-se de um termômetro instalado no campo experimental, em meio às plantas. A temperatura foliar (T_f) e a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) interceptada pela folha (RFA_i) foram medidas por meio de um analisador de gases a infravermelho portátil (*LCpro+*, Analytical Development Company, Hoddesdon, Reino Unido). O déficit de pressão de vapor entre o interior da folha e a atmosfera (δe) foi calculado segundo Landsberg (1986). A inclinação

foliar foi medida em relação ao horizonte (= 0°), utilizando-se de 10 folhas por cada parcela experimental.

2.2 - Trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (g_s) e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) foram medidas em sistema aberto, sob luz e concentração de CO_2 ambientes, com o analisador de gases a infravermelho já mencionado. Para a estimativa daqueles parâmetros, cada repetição foi constituída de uma única folha por planta, procedendo-se às medições às 09:00, 12:00 e 15:00 h. As curvas de respostas fotossintéticas à luz (A/RFA) foram determinadas em laboratório, variando-se RFA, de 0 a 1400 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 5 min, a 25°C e condições ambientes de CO_2 (aproximadamente 370 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), conforme Iio et al. (2005).

2.3 - Parâmetros de fluorescência da clorofila a

Os parâmetros de fluorescência, no campo, foram medidos nas mesmas folhas e horários utilizados para as medições de trocas gasosas, por meio de um fluorômetro modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido); adicionalmente, a razão F_v/F_m também foi medida na antemanhã. Após serem adaptados ao escuro, por 30 min, tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante [1-2 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$], para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, à intensidade de 6000 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 1 s, foi aplicado, para estimar-se a fluorescência máxima emitida (F_m). Nas amostras adaptadas ao escuro, a eficiência fotoquímica máxima do FSII foi estimada pela razão entre as fluorescências variável e máxima [$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$]. Nas amostras adaptadas à luz, a fluorescência constante (F_s) foi estimada, expondo-se o tecido foliar à irradiância artificial correspondente àquela interceptada naturalmente pela folha, por 90 s e, subsequentemente, um pulso de luz saturante [6000 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 1 s] foi aplicado, para medir-se a fluorescência máxima das amostras sob luz (F_m'). Com esses parâmetros, estimou-se o rendimento quântico fotoquímico do transporte de elétrons através do FSII [$\Phi_{\text{FSII}} = (F_m' - F_s')/F_m'$], conforme Genty et al. (1989). Posteriormente, foi estimada F_0 adaptada à luz [$F_0' = F_0/(F_v/F_m + F_0/F_m')$] (Niinemets & Kull, 2001).

Para calcular-se a taxa de transporte de elétrons (TTE), considerou-se que tanto o FSII como o FSI absorvem quantidades iguais de luz; para a estimativa de RFA absorvida, a absorvância foliar foi calculada a partir da concentração de clorofila por unidade de área (Evans, 1993). A TTE foi estimada como:

$$\text{TTE} = (\text{RFA interceptada pela folha}) \times (\text{absortância foliar}) \times \Phi_{\text{FSII}} \times 0,5$$

Foram estimados, ainda, os coeficientes de extinção fotoquímica [$q_p = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$] e não-fotoquímica [NPQ = $(F_m/F_m') - 1$] (Krause & Weis, 1991), a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII [$F_v'/F_m' = (F_m' - F_0')/F_m'$] e a fração da irradiância não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente [$P_E = (F_v'/F_m') \times (1 - q_p)$] (Demmig-Adams et al., 1996).

Em laboratório, foram avaliadas as respostas de diversos parâmetros de fluorescência, em função da irradiância, objetivando-se observar a capacidade de utilização fotoquímica e de dissipação não-fotoquímica da energia luminosa. Para isso, folhas de café foram coletadas e levadas ao laboratório, onde foram submetidas a várias irradiâncias, utilizando-se, também, do fluorômetro modulado supracitado. Após serem adaptados ao escuro por 30 min, tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante [$1-2 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$], para a determinação de F_0 . Em seguida, um pulso de luz saturante [$6000 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 1 s] foi aplicado para estimar-se F_m . Subseqüentemente, as folhas foram irradiadas com luz actínica, durante 240 s, às intensidades de 150, 300, 450, 600, 900 e 1500 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para a obtenção de F_s . Em seguida, outro pulso de luz saturante [$6000 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$] foi aplicado, por 1 s, para obtenção de F_m' . A luz actínica foi desligada e as amostras foram irradiadas com luz vermelho-distante, para a obtenção de F_0' . Foram estimados, então, q_p , NPQ, P_E e Φ_{FSII} , conforme já descrito.

2.4 - Pigmentos

Clorofilas e carotenóides totais foram extraídos em acetona (80%, v/v) e estimados espectrofotometricamente, como descrito em Lichtenthaler (1987).

2.5 - Nitrogênio total

Após a secagem das amostras foliares a 70°C, por 72 h, foram determinados o nitrogênio orgânico, conforme Jackson (1958), e o nitrogênio nítrico, de acordo com Cataldo et al. (1975). A soma das duas frações representa o nitrogênio total.

2.6 - Estresse oxidativo induzido por PQ

Com o intuito de avaliar-se a tolerância potencial de folhas ao estresse oxidativo, induziu-se o estresse oxidativo com PQ, avaliando-se o comportamento de F_v/F_m e de algumas enzimas do sistema antioxidante. Para isso, discos foliares de 1,4 cm de diâmetro foram infiltrados a vácuo (três pulsos de 1 min) com soluções de PQ, às concentrações de 0,

5, 10 e 20 μM . Após a infiltração, os discos foram incubados nas respectivas soluções, em placas de Petri, sob obscuridade, por 16 h, a 25 °C, seguindo-se de incubação a 200 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 3 h, a 25 °C. Após um período de 30 min de adaptação ao escuro, avaliou-se a razão F_v/F_m em discos coletados imediatamente após o tratamento com PQ, conforme supradescrito. Subseqüentemente, os discos foliares para as análises enzimáticas foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, até o momento do uso, quando se procedeu à determinação das atividades da SOD (EC 1.15.1.1), CAT (EC 1.11.1.6), APX (EC 1.11.1.11) e GPX (EC 1.11.1.9), conforme descrito abaixo.

2.7 - Atividades enzimáticas

Para o experimento de campo, foram determinadas as atividades de algumas enzimas-chave do sistema antioxidante: SOD (Giannopolitis & Ries, 1977), CAT (Havir & Mchale, 1987) e APX (Nakano & Asada, 1981). Detalhes adicionais estão descritos em Pinheiro et al. (2004). A atividade dessas enzimas foi expressa em unidades (U) por grama de massa seca. Cada U corresponde à oxidação de 1 μmol ascorbato min^{-1} (APX) ou à oxidação de 1 μmol H_2O_2 min^{-1} (CAT). Para a SOD, cada U corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do corante azul de nitro-tetrazólio. No experimento em que se induziu o estresse oxidativo utilizando-se de soluções de PQ, determinou-se, ainda, a atividade da GPX, conforme Nagalakshmi & Prasad (2001). A reação ocorreu em 250 μL de meio de reação contendo 0,5 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 10 mM de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 1,14 M de NaCl , 10 mM de glutathiona reduzida, 2 mM de NADPH e 2,5 mM de H_2O_2 . A reação foi iniciada pela adição de uma unidade da enzima redutase da glutathiona. O consumo de NADPH foi rastreado a 340 nm, por 3 min.

2.8 - Peróxido de hidrogênio e danos celulares

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada conforme Lee & Lee (2000). Danos celulares, que indicam a ocorrência de estresse oxidativo, foram avaliados por meio da peroxidação de lipídios, via acúmulo de aldeído malônico (MDA) (Cakmak & Horst, 1991).

2.9 - Estatística

Os experimentos foram instalados e analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, à exceção das curvas de respostas fotossintéticas à luz, com três repetições. Cada unidade experimental foi composta por uma planta. Nas avaliações de campo, utilizou-se de um esquema fatorial 4 x 3 (quatro posições na planta - faces leste e oeste; estratos superior e inferior - e três horários de avaliação). No experimento em que se induziu o

estresse oxidativo com soluções de PQ, o esquema fatorial foi 4 x 4 (folhas de quatro posições na planta e quatro concentrações de PQ). As médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade, utilizando-se do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 1997). Os dados referentes às curvas de respostas fotossintéticas à luz se ajustaram ao modelo hiperbólico retangular $[y=y_0+a*x/(b+x)]$, enquanto os dados referentes à utilização da RFA em processos fotoquímicos e não-fotoquímicos se ajustaram ao modelo sigmoidal logístico $\{y=y_0+a/[1+(x/x_0)^b]\}$, utilizando-se do programa gráfico estatístico SigmaPlot (SigmaPlot, 2004) para a obtenção de tais ajustes.

3.0 - RESULTADOS

3.1 - Ambiente

A temperatura mínima observada na noite anterior à avaliação das trocas gasosas e dos parâmetros de fluorescência foi de 9°C, enquanto a máxima do dia, alcançada por volta das 14:00 h, chegou a 28°C (não mostrado). A temperatura ambiente foi de 19°C às 09:00 h e próximo de 25°C nos demais horários (não mostrado). Às 08:00 h, a RFA_i foi, para as faces leste e oeste, menor que $300 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Na face leste, RFA_i foi máxima [em torno de $1300 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$] pela manhã, seguindo uma rápida e progressiva queda já a partir das 10:00 h, de forma que, a partir das 13:00 h, RFA_i foi sempre menor que $150 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1). Na face oeste, RFA_i passou a aumentar a partir das 10:00 h, atingindo valores máximos e superiores a $1500 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ às 14:00 h; registre-se, porém, que, por volta das 12:00/13:00 h, RFA_i já era superior a $900 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mantendo-se acima desse valor até às 16:00 h, independentemente do estrato analisado (Figura 1). Na face oeste, RFA_i média diária foi de 950 e 700 $\mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$, contra 500 e 300 $\mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na face leste, nas folhas do estrato superior e inferior, respectivamente (Figura 1). A T_f e o δe apresentaram comportamento semelhante ao longo do dia (Figura 1). Na face leste, independentemente do estrato, T_f manteve-se em torno dos 30°C, e δe , por volta de 3 kPa, no decorrer do dia (Figura 1). Os valores de T_f e δe , na face oeste, foram aumentados progressivamente ao longo do dia, de forma que T_f chegou a 40°C, e δe , a 6 kPa, às 15:00 h (Figura 1), fato possivelmente associado, em larga escala, à elevada RFA_i (Figura 1).

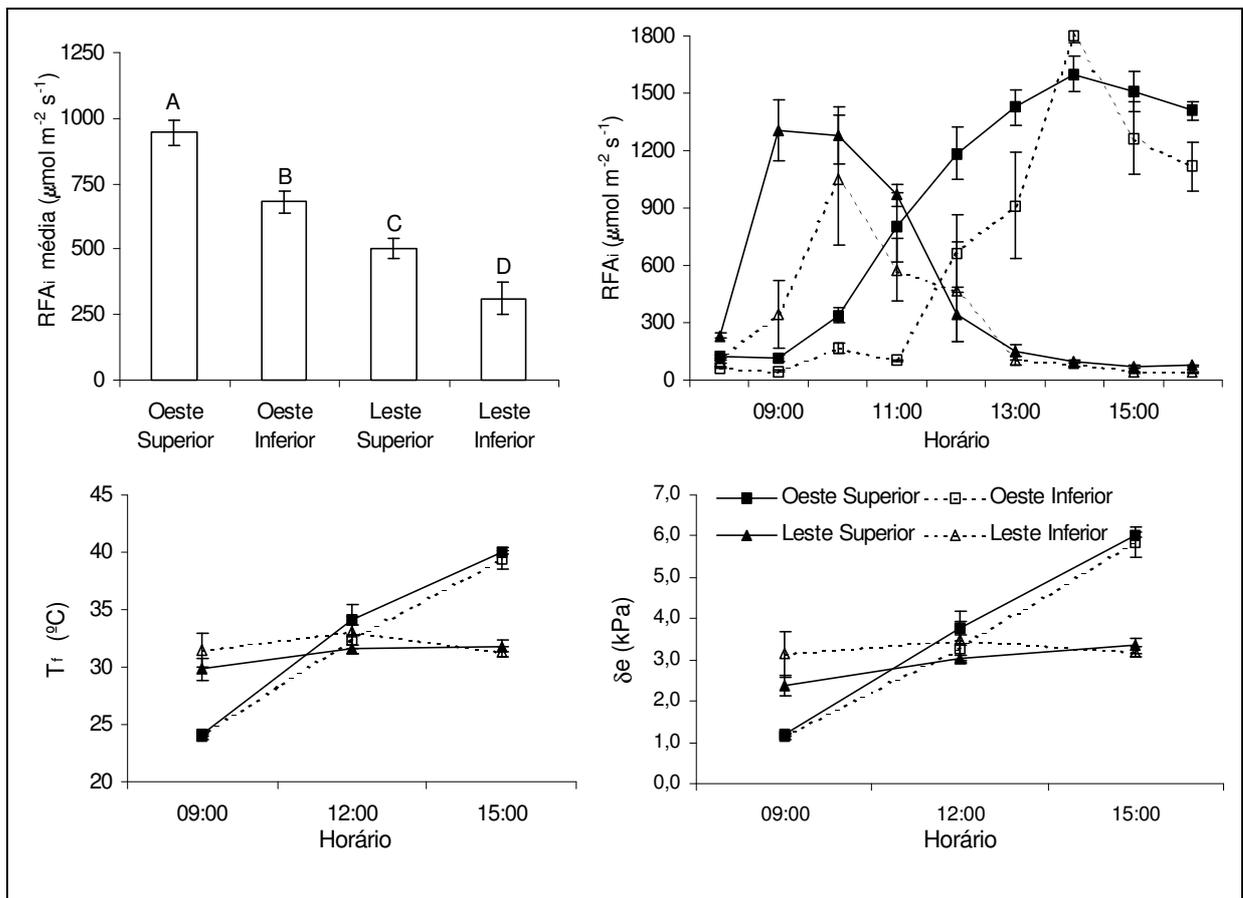


Figura 1 - Média diária da radiação fotossinteticamente ativa interceptada pelas folhas (RFA_i) (08-16:00 h) e curso diurno da RFA_i , da temperatura foliar (T_f) e do déficit de pressão de vapor entre a folha e a atmosfera (δe) em folhas de café, nas faces leste e oeste da copa, nos estratos superior e inferior do dossel. Para RFA_i média, barras seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,05$; teste de Newman-Keuls). As barras indicam o erro-padrão da média ($n = 6$)

3.2 - Trocas gasosas e ângulo foliar

Na face leste, a magnitude das trocas gasosas foi similar entre os estratos, em todos os horários ($P > 0,05$). Nessa face, A foi máxima às 09:00 h ($P < 0,05$), enquanto na face oeste A foi mantida praticamente constante ao longo do dia (Figura 2). Nas avaliações executadas às 12:00 h e às 15:00 h, A foi sempre maior em folhas da face oeste ($P < 0,05$), independentemente do estrato investigado (Figura 2). O comportamento de g_s , no decorrer do dia, foi semelhante, independentemente de faces e estratos, apresentando valor máximo às 09:00 h ($P < 0,05$) (Figura 2). Por outro lado, a razão C_i/C_a apresentou comportamento inverso entre faces, qualquer que seja o estrato considerado (Figura 2). Na face leste, C_i/C_a foi menor pela manhã ($P < 0,05$), sendo incrementada ao longo do dia ($P < 0,05$), e nas folhas da face oeste, C_i/C_a foi maior pela manhã (Figura 2). Reduções em g_s , na face leste, pareceram não estar diretamente envolvidas

com variações em δ_e , que se manteve constante ao longo do dia, mas, talvez, com o aumento de C_i/C_a . Em folhas da face oeste, a queda de g_s , ao longo do dia, ocorreu em paralelo a incrementos progressivos em T_f e em δ_e (Figura 2). Não houve nenhuma variação no ângulo foliar ao longo do dia, independentemente da face e do estrato; entretanto, o ângulo foliar foi sempre maior ($P < 0,05$) em folhas da face oeste, em especial no estrato superior (Figura 2).

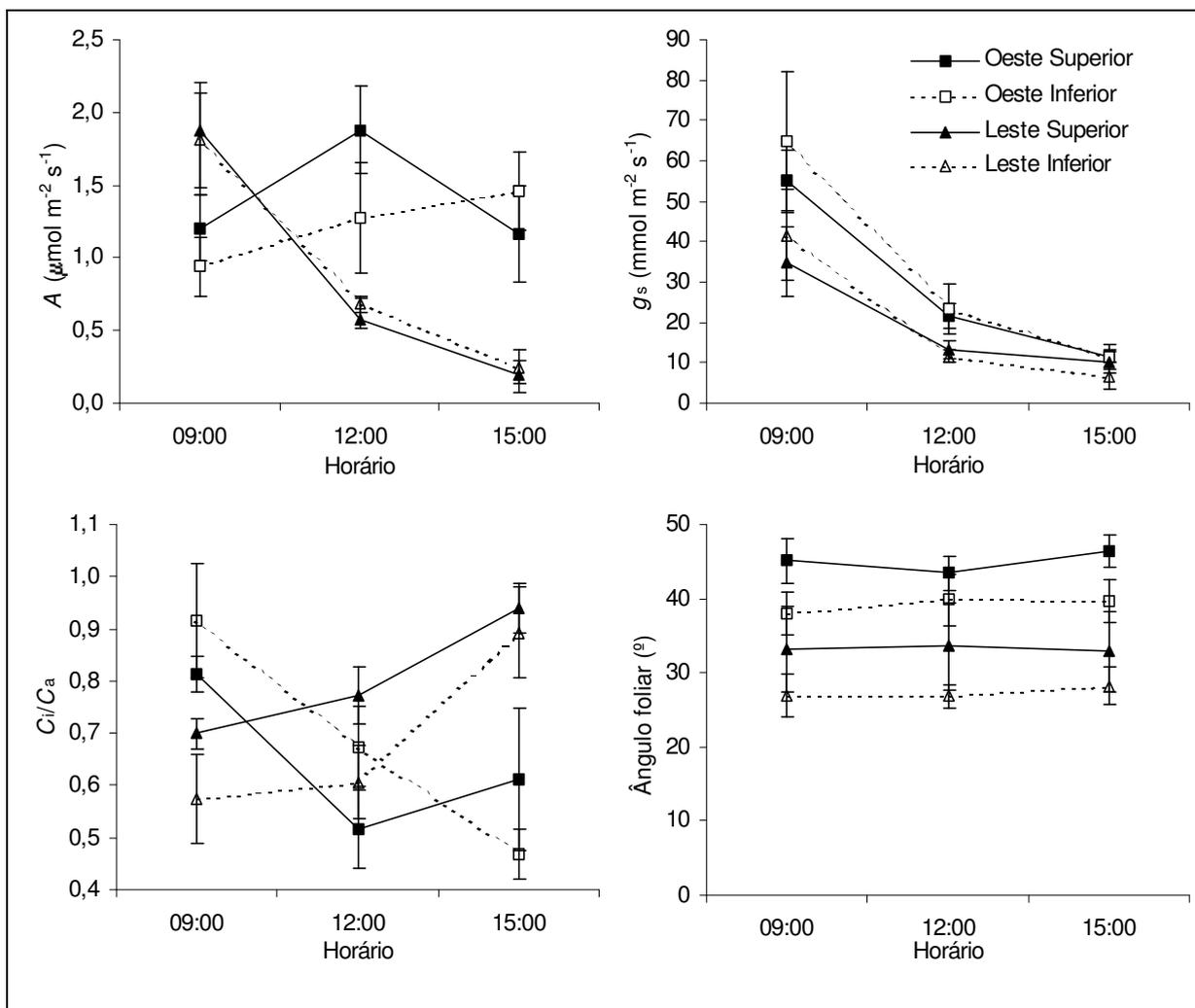


Figura 2 - Curso diurno da taxa de assimilação líquida de carbono (A), da condutância estomática (g_s), da razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) e do ângulo foliar em café, nas faces leste e oeste da copa, nos estratos superior e inferior do dossel. As barras indicam o erro-padrão da média ($n = 6$)

3.3 - Respostas fotossintéticas à radiação fotossinteticamente ativa

A irradiância de saturação (I_s) foi sempre maior nas folhas do estrato superior ($P < 0,05$), independentemente da face analisada (Figura 3), ficando em torno de $500 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

nos estratos superiores, e em torno de $400 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nos estratos inferiores. De forma similar, a irradiância de compensação (I_c), para folhas dos estratos superiores, foi maior ($P < 0,05$) em, aproximadamente, 89% na face oeste, e 68%, na face leste, assumindo valores médios próximos de $36 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas folhas dos estratos superiores, e $20 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas folhas dos estratos inferiores, conforme se infere da Figura 3. Não se observou queda em A , independentemente dos tratamentos, até $1400 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

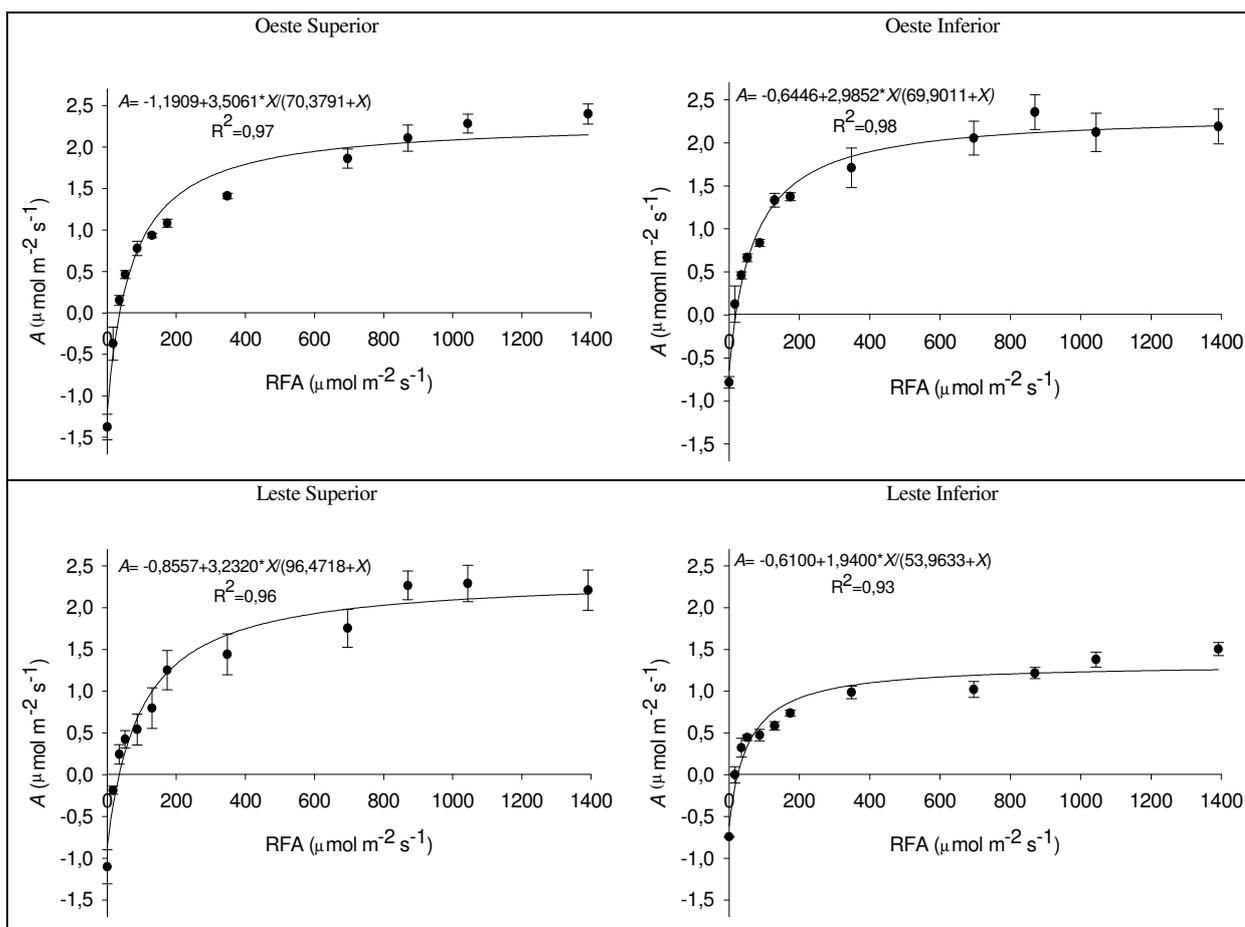


Figura 3 - Respostas fotossintéticas à radiação fotossinteticamente ativa (RFA) em folhas de plantas de café, nas faces oeste e leste da copa, nos estratos superior e inferior do dossel. As barras indicam o erro-padrão da média ($n = 3$)

3.4 - Fotoinibição e fluorescência da clorofila a

Na antemanhã, a eficiência fotoquímica máxima do FSII, avaliada pela razão F_v/F_m , foi menor em folhas da face oeste ($P < 0,05$), especialmente no estrato superior, no qual foi registrado um valor de 0,72 (Figura 4), sugerindo, assim, a ocorrência de uma discreta fotoinibição crônica nessa face. Contudo, nas folhas localizadas em ambos estratos da face leste,

aquela razão se manteve sempre acima de 0,80. Nas folhas da face oeste, F_v/F_m decaiu às 15:00 h, sendo tal queda significativa apenas no estrato inferior ($P < 0,05$) (Figura 4). Nenhuma diferença em F_0 foi registrada entre folhas de diferentes faces ou estratos, tanto na antemã quanto no decorrer do dia (Figura 4). Houve pouca alteração em F_m ao longo do dia, ressaltando-se, no entanto, que F_m foi sempre menor nas folhas da face oeste ($P < 0,05$), independentemente dos estratos avaliados (Figura 4).

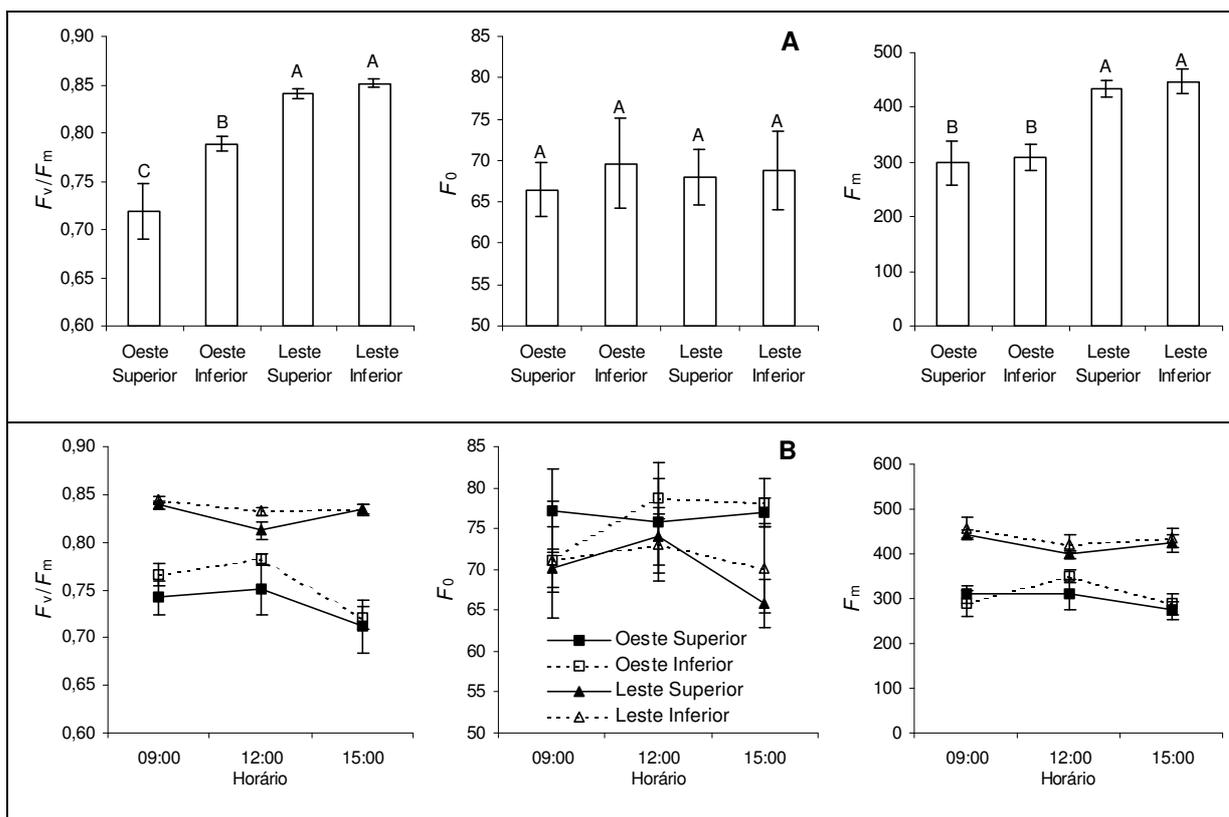


Figura 4 - Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m) na antemã (A), e curso diurno desses parâmetros (B) em folhas de café, nas faces leste e oeste da copa, nos estratos superior e inferior do dossel. Em A, colunas seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,05$; teste de Newman-Keuls). As barras indicam o erro-padrão da média ($n = 6$)

O rendimento quântico fotoquímico de transporte de elétrons através do fotossistema II (Φ_{FSII}), o coeficiente de extinção fotoquímica (q_p) e a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (F_v'/F_m') apresentaram comportamento semelhante entre estratos da mesma face (Figura 5). Esses parâmetros foram bastante reduzidos às 09:00 h em folhas do estrato superior da face leste, apresentando expressivo aumento às 12:00 h e 15:00 h ($P < 0,05$). De modo contrário, em folhas da face oeste, os valores de Φ_{FSII} , q_p e F_v'/F_m' foram reduzidos em grande extensão ($P < 0,05$), às 15:00 h, em relação aos obtidos às 09:00 h. A taxa de transporte de elétrons (TTE), independentemente de faces e estratos, atingiu o valor máximo às 12:00 h ($P < 0,05$), sendo mantida elevada somente

nas folhas da face oeste ($P < 0,05$), às 15:00 h (Figura 5). O coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) e a fração de irradiância não-utilizada na fase fotoquímica e nem dissipada termicamente (P_E) apresentaram comportamento oposto ao apresentado por Φ_{FSII} , q_p e F_v'/F_m' (Figura 5). Nas folhas do estrato superior da face leste, NPQ e P_E foram elevados às 09:00 h. Em folhas da face oeste, em especial do estrato superior, NPQ e P_E foram máximos às 12:00 h ($P < 0,05$), sendo mantidos elevados às 15:00 h (Figura 5). Nas folhas do estrato superior da face oeste, às 12:00 h, os valores NPQ e P_E foram muito maiores que os apresentados pelas folhas do estrato inferior ($P < 0,05$) (Figura 5).

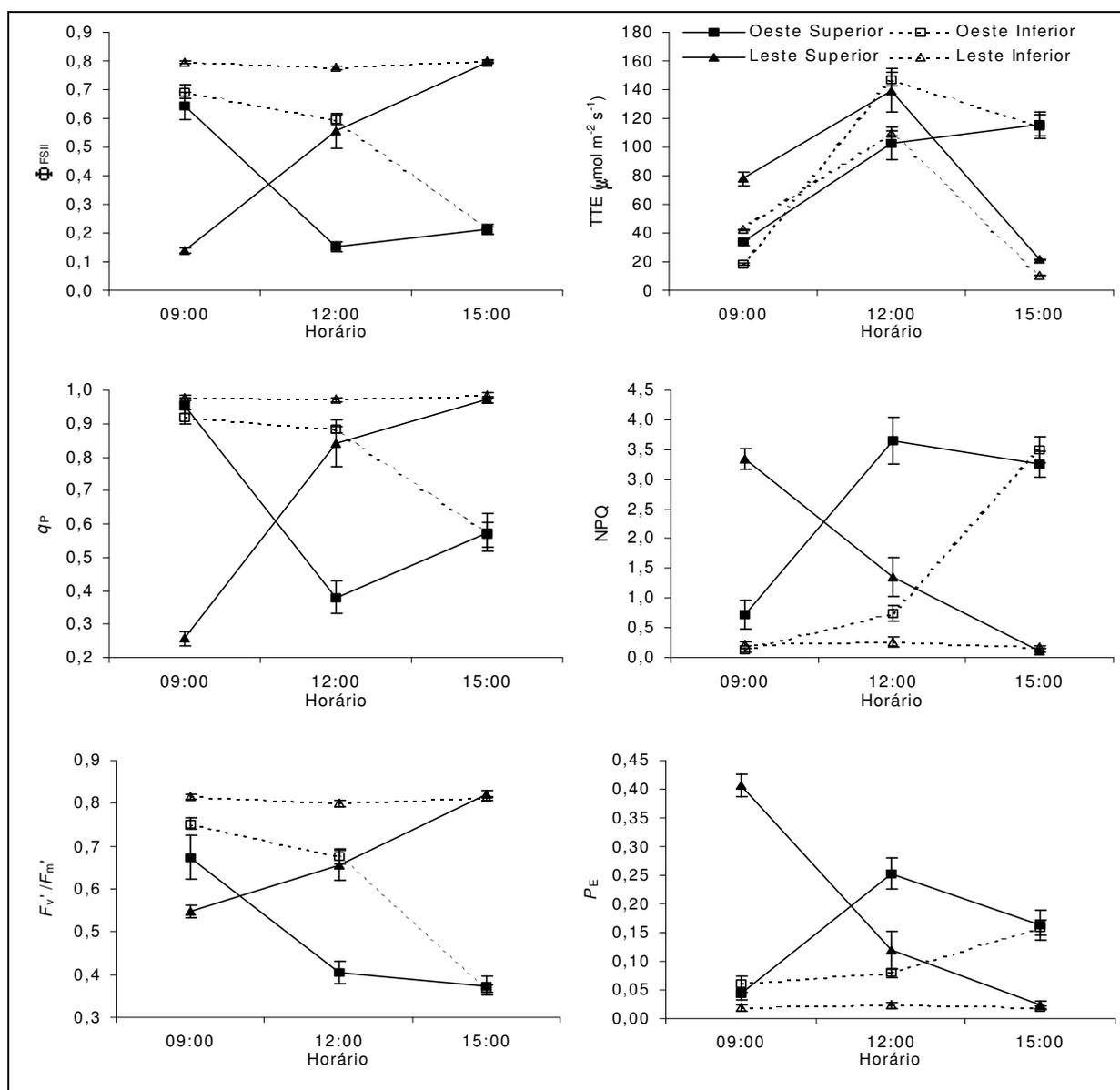


Figura 5 - Curso diurno do rendimento quântico de transporte de elétrons através do fotossistema II (Φ_{FSII}), da taxa de transporte de elétrons (TTE), dos coeficientes de extinção fotoquímica (q_p) e não-fotoquímica (NPQ), da eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (F_v'/F_m') e da fração de irradiância não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente (P_E) em folhas de café, nas faces leste e oeste da copa, nos estratos superior e inferior do dossel. As barras indicam o erro-padrão da média ($n = 6$)

3.5 - Utilização da radiação fotossinteticamente ativa em processos fotoquímicos e não-fotoquímicos

Devido à grande similaridade de respostas obtidas entre folhas dos estratos de uma mesma face, para cada valor de RFA, procedeu-se à análise dos dados médios de cada face, e não dos estratos das faces. De modo geral, o incremento em RFA, particularmente acima de $450 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$, resultou em aumentos de NPQ e P_E paralelamente a reduções em Φ_{FSII} e q_P , sendo tal resposta similar entre faces (Figura 6).

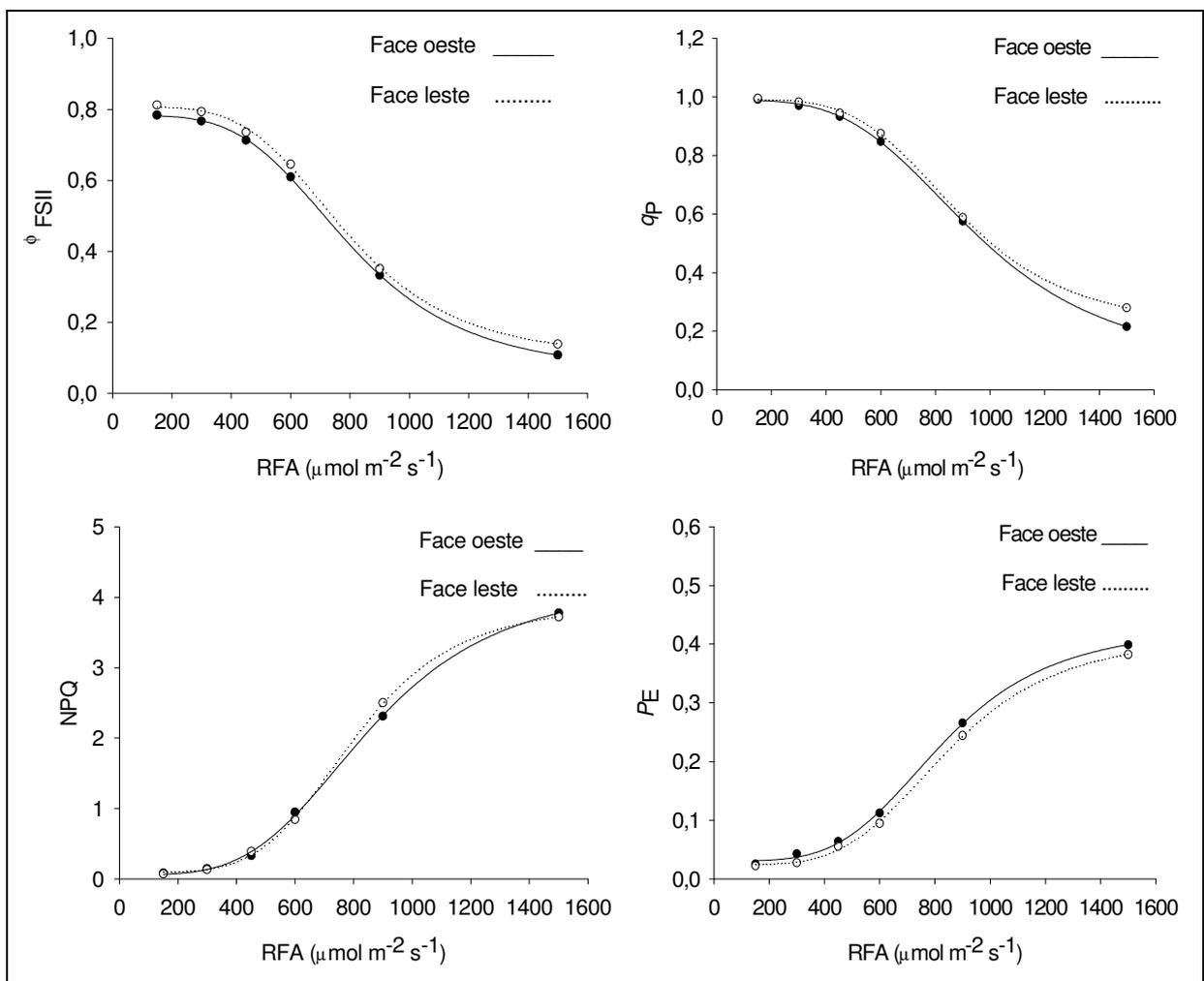


Figura 6 - Variação do rendimento quântico do transporte de elétrons através do fotossistema II (Φ_{FSII}), dos coeficientes de extinção fotoquímica (q_P) e não-fotoquímica (NPQ), e da energia não utilizada na fase fotoquímica e nem dissipada termicamente (P_E), em função da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) aplicada, em folhas das faces leste e oeste da copa de plantas de café. Para todos os parâmetros, os valores representam a média dos estratos superior e inferior de cada uma das faces. $n = 6$

3.6 - Clorofilas, carotenóides e nitrogênio total

As concentrações de clorofilas *a* e *b* foram maiores em folhas do estrato inferior ($P < 0,05$), independentemente da face (não mostrado). Conseqüentemente, a concentração total de clorofila foi maior (36%) em folhas dos estratos inferiores ($P < 0,05$) (Figura 7). De forma semelhante, houve maior concentração de carotenóides totais nos estratos inferiores de cada face analisada ($P < 0,05$) (Figura 7). Não foi observada qualquer diferença na razão clorofila *a*/clorofila *b*, bem como na razão clorofilas totais/carotenóides totais (Figura 7), independentemente de estratos ou faces. A concentração foliar de nitrogênio total não diferiu

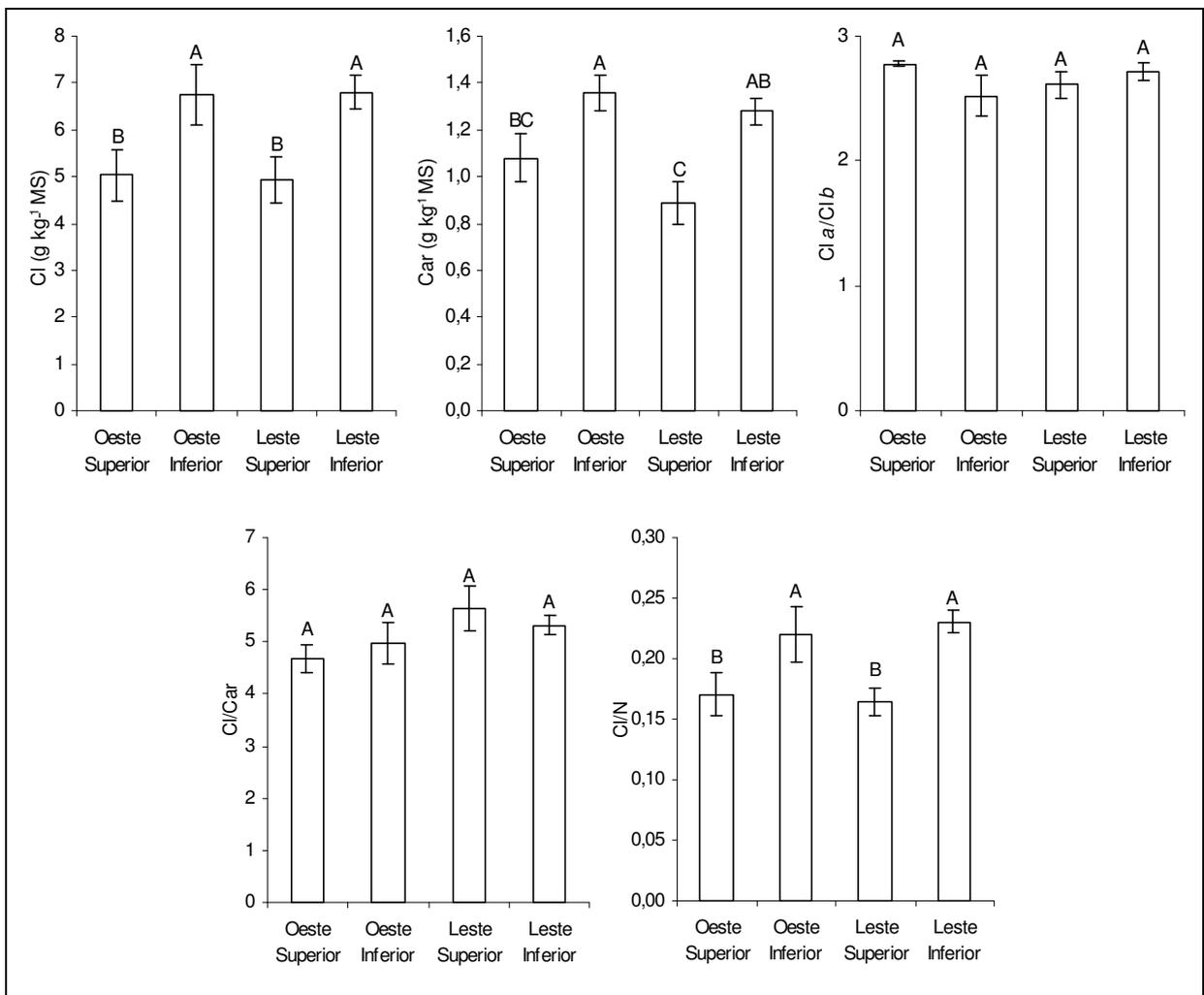


Figura 7 - Concentração de clorofila total (Cl), de carotenóides totais (Car), razão Cl *a*/Cl *b*, razão Cl/Car e razão clorofilas totais/ nitrogênio total (Cl/N) em folhas de café, nas faces leste e oeste da copa, nos estratos superior e inferior do dossel. Estatística conforme Figura 4 A

entre faces, bem como entre estratos, ficando sempre próxima a 29 g kg⁻¹ MS (não mostrado), valor indicativo de que as plantas não sofreram de deficiência de nitrogênio (Malavolta et al.,

1993). Assim, as menores concentrações de clorofilas observadas nos estratos superiores não devem estar associadas a diferenças na disponibilidade de nitrogênio. A razão clorofilas totais/nitrogênio total foi sempre maior nas folhas dos estratos inferiores ($P < 0,05$) (Figura 7).

3.7 - Atividades enzimáticas

De modo geral, folhas dos estratos superiores, de ambas as faces, apresentaram maior atividade da SOD ($P < 0,05$) (Figura 8). Por outro lado, não houve nenhuma diferença significativa na atividade da CAT, independentemente de faces ou estratos, havendo, porém, uma tendência de aumento de sua atividade nas folhas dos estratos inferiores (Figura 8). A atividade da APX seguiu a mesma tendência da CAT, mas as folhas do estrato inferior da face oeste exibiram atividade de APX significativamente maior (23%) ($P < 0,05$) em relação à das folhas do estrato superior da face leste (Figura 8).

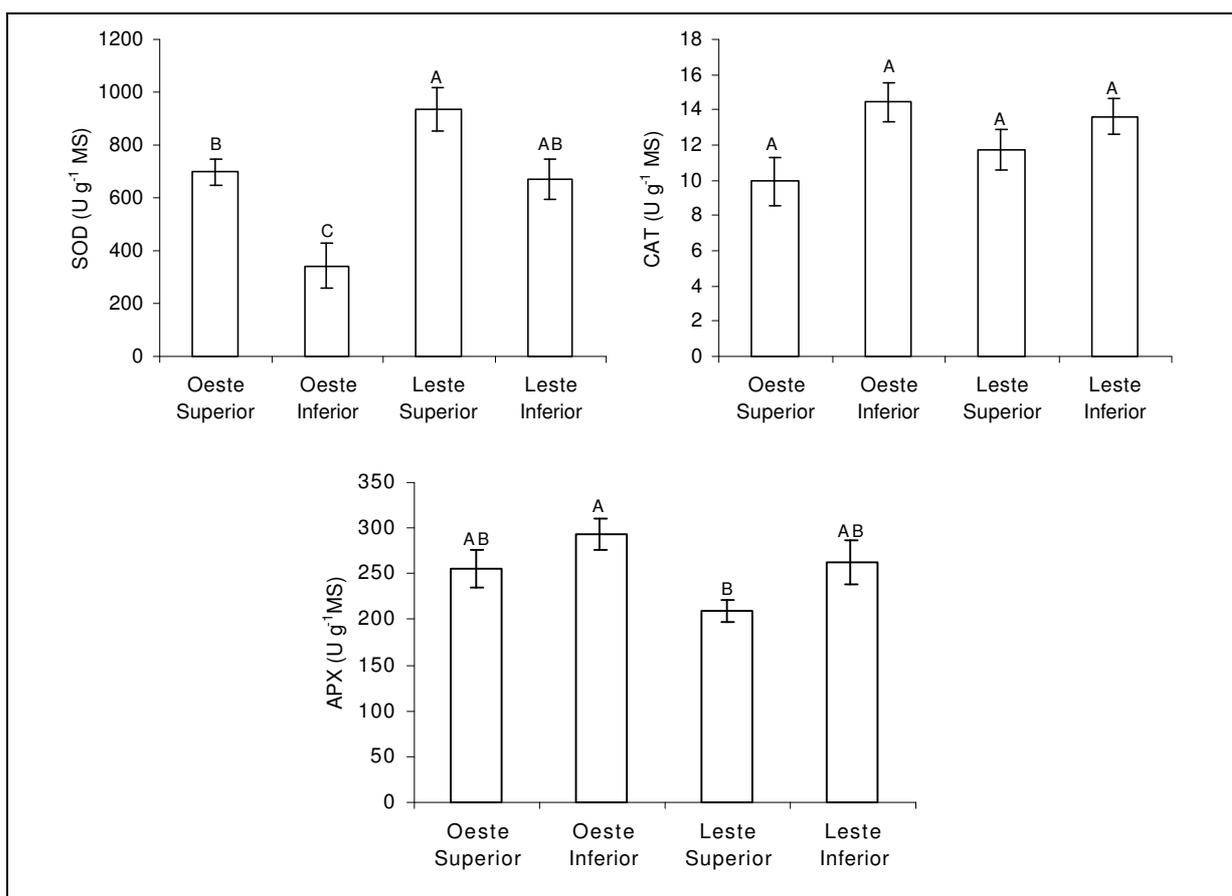


Figura 8 - Atividade da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT) e da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de café, nas faces leste e oeste da copa, nos estratos superior e inferior do dossel. Estatística conforme Figura 4 A

3.8 - Peróxido de hidrogênio e danos celulares

A concentração de H_2O_2 foi maior em folhas dos estratos superiores, sem, contudo, haver diferenças significativas entre folhas das faces oeste e leste em cada estrato (Figura 9). Em relação à concentração de aldeído malônico (MDA), não houve qualquer diferença entre seus valores médios entre estratos, bem como entre faces (Figura 9).

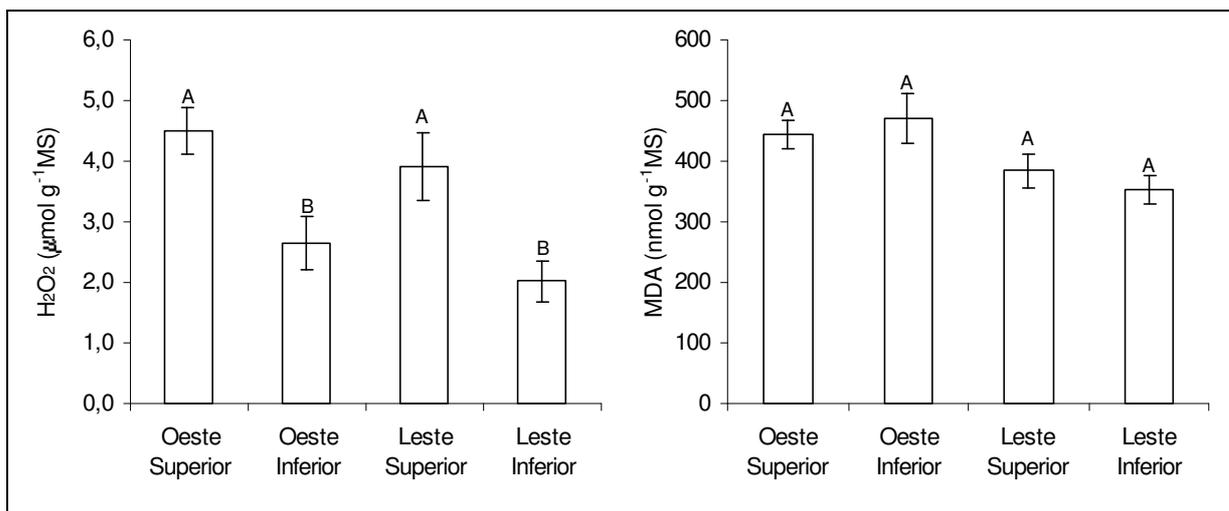


Figura 9 - Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de aldeído malônico (MDA) em folhas de café, nas faces leste e oeste da copa, nos estratos superior e inferior do dossel. Estatística conforme Figura 4 A

3.9 - Estresse oxidativo induzido por Paraquat (PQ)

Observou-se um decréscimo progressivo na razão F_v/F_m , na medida em que se aumentava a concentração de PQ nas quais os discos foliares foram incubados (Figura 10). Este ensaio foi repetido quatro vezes, observando-se sempre a mesma tendência. Não obstante, os decréscimos em F_v/F_m foram significativos ($P < 0,05$) à concentração de 5, 10 e 20 μM de PQ, para discos foliares de todos os estratos e faces, em relação ao tratamento-controle (0,0 μM de PQ), mas as quedas observadas em F_v/F_m a partir de PQ a 5 μM não mais foram significativas ($P > 0,05$). A redução da razão F_v/F_m , com o incremento de PQ, foi, em média, de 60% na face oeste, contra uma redução de 42% na face leste, à concentração de 5 μM (Figura 10). Não houve qualquer diferença significativa na razão F_v/F_m entre folhas dos estratos, em cada uma das faces, mas os valores de F_v/F_m foram sempre maiores nos discos foliares oriundos da face leste ($P < 0,05$), em relação aos da face oeste, independentemente das concentrações nas quais os discos foram incubados (Figura 10).

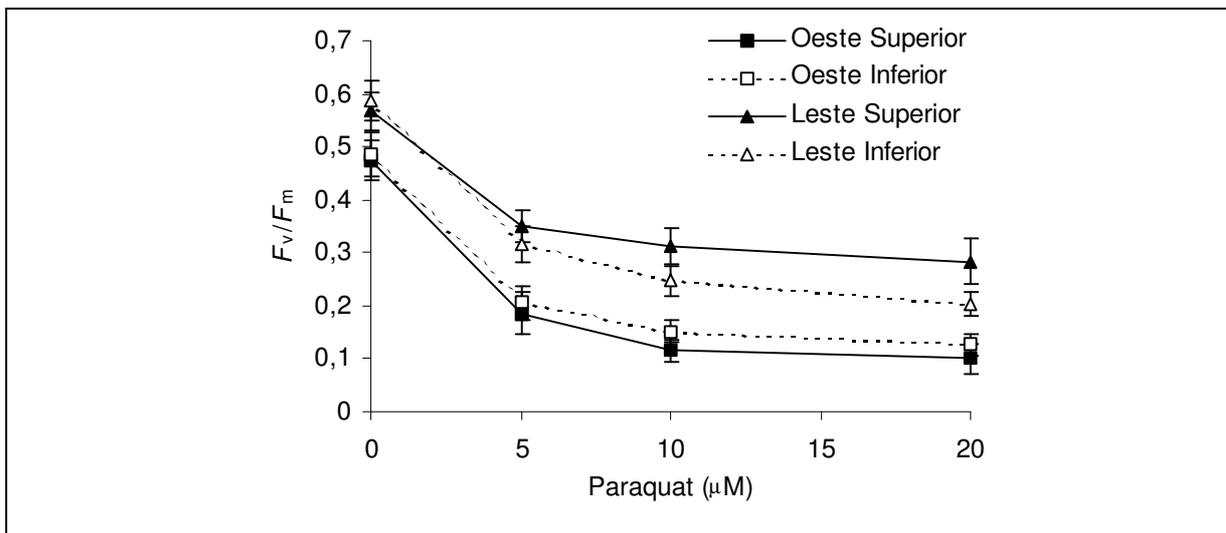


Figura 10 - Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) em discos foliares de café, das faces leste e oeste da copa, nos estratos superior e inferior das plantas, submetidos a soluções de Paraquat (PQ) em diferentes concentrações. As barras indicam o erro-padrão da média ($n = 6$)

De maneira geral, incrementos na concentração das soluções de PQ, de 0,0 para 10 μM , resultaram em acréscimo na atividade da SOD em discos foliares da face leste ($P < 0,05$), e na manutenção na atividade dessa enzima em discos foliares da faces oeste, independentemente do estrato considerado (Figura 11). À exceção do estrato superior da face oeste, PQ a 20 μM acarretou queda na atividade da SOD em relação à concentração da 10 μM ($P < 0,05$). Sob diferentes concentrações de PQ, discos foliares dos estratos superiores apresentaram maior atividade de SOD em relação aos inferiores ($P < 0,05$) (Figura 11). Para CAT, os tratamentos com PQ, particularmente a 20 μM , resultaram em queda da atividade da enzima ($P < 0,05$), exceto em discos foliares do estrato superior da face leste (Figura 11). Considerando-se as diferentes concentrações de forma isolada, quase não houve diferenças na atividade de CAT entre estratos e faces (Figura 11). De forma similar à CAT, a atividade da APX foi reduzida nos discos foliares tratados com PQ (Figura 10). De modo geral, PQ, a 5 μM , resultou em queda na atividade de APX ($P < 0,05$), não se observando decréscimos adicionais a concentrações de PQ superiores àquela. Para cada concentração de PQ, houve tendência de maior atividade de APX nos discos foliares dos estratos superiores, principalmente na face oeste (Figura 11). Nos discos foliares do estrato superior da face oeste, não houve variação na atividade de GPX com o incremento da concentração de PQ, porém, no estrato inferior dessa face, e em ambos estratos da face leste, a atividade máxima da enzima ocorreu com PQ a 10 μM ($P < 0,05$) (Figura 11). Dentro de cada concentração de PQ, discos foliares dos estratos inferiores, das duas faces, apresentaram ($P < 0,05$), ou pelo menos tenderam a apresentar, maior atividade de GPX, exceto discos foliares da face leste, a 10 μM (Figura 11).

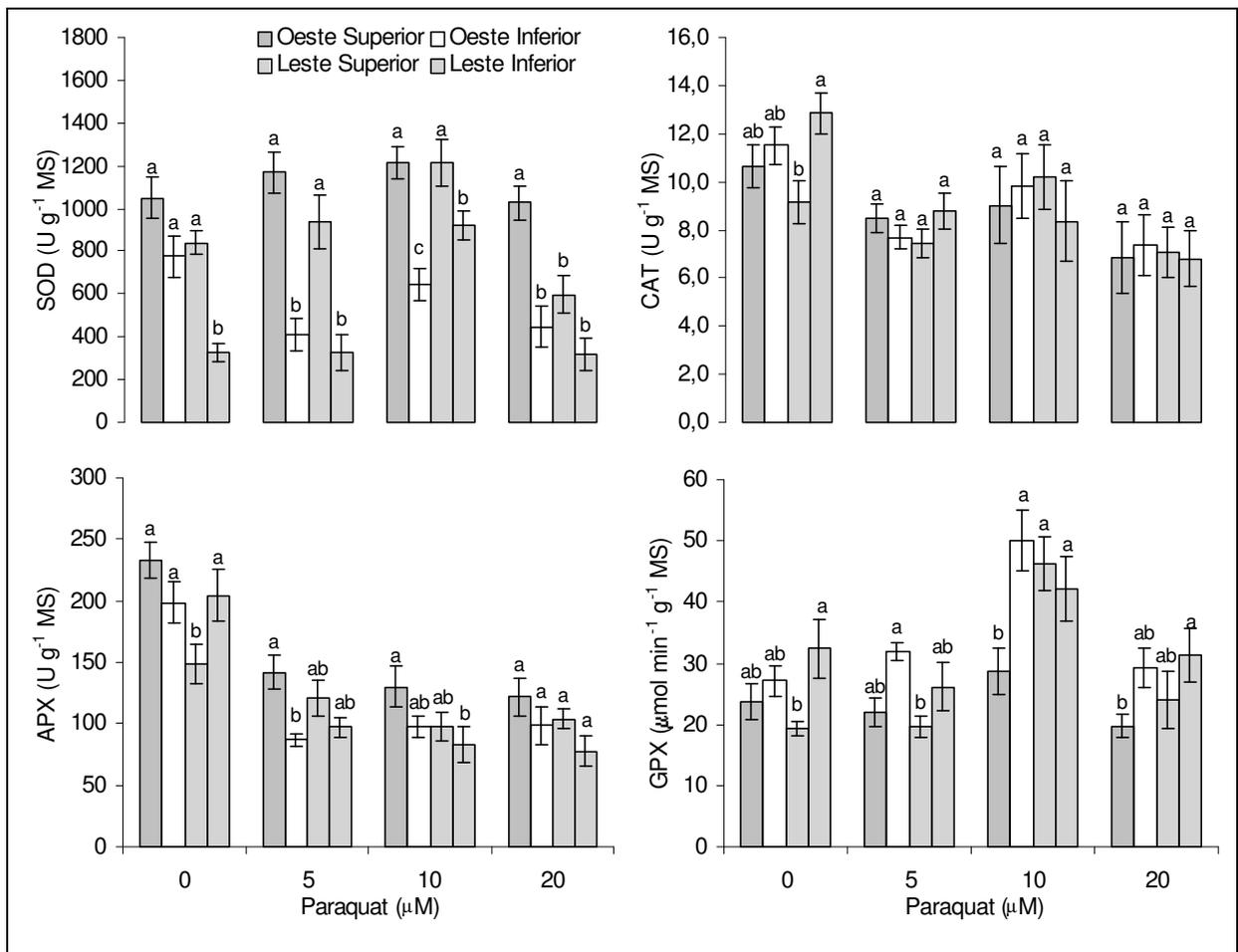


Figura 11 - Atividade da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), da peroxidase do ascorbato (APX) e da peroxidase da glutaciona (GPX) em discos foliares de café, das faces leste e oeste da copa, nos estratos superior e inferior das plantas, tratados com Paraquat (PQ) a diferentes concentrações. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as posições na copa, em cada concentração de PQ ($P < 0,05$, Newman-Keuls). As barras indicam o erro-padrão da média ($n = 6$)

4.0 - DISCUSSÃO

Os valores máximos das taxas de assimilação líquida de carbono (A) foram, de modo geral, extremamente baixos e similares aos observados por Chaves (2005) em café cultivado em campo, sob condições semelhantes às deste trabalho. Tais valores são bem inferiores aos valores máximos já relatados para café cultivado em condições de campo ($\sim 12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conforme observado por Silva et al. (2004). Mesmo no período da manhã, especialmente em folhas da face leste, quando g_s e C_i/C_a foram relativamente elevadas e RFA_i já era saturante, A foi muito baixa, indicando a ocorrência de limitações não-estomáticas à fotossíntese. No cafeeiro, tais limitações parecem ser largamente consequência de temperaturas noturnas relativamente baixas, ainda que os fatores ambientes se mostrem favoráveis à fotossíntese (Silva et al., 2004; DaMatta et al., 1997; Bauer et al., 1985). Nas folhas da face oeste, apesar de g_s e C_i/C_a terem decrescido ao longo do dia, A permaneceu constante, evidenciando que o fechamento estomático pouco ou nada afetou o comportamento de A . Registre-se, não obstante, que, em alguns horários, RFA_i foi bem inferior àquela necessária para saturar a maquinaria fotossintética e, por conseguinte, limitações de luz à fotossíntese podem revestir-se de grande importância.

As folhas localizadas nos estratos superiores, de ambas as faces, apresentaram maior I_s e I_c , relativamente às das folhas dos estratos inferiores, provavelmente devido à maior RFA_i em grande parte do dia. Conforme aqui observado, em folhas isoladas de café, os valores de I_s são normalmente baixos, entre 300-600 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com plantas cultivadas à sombra, ou folhas mais internas da copa, mostrando os menores valores (Kumar & Tieszen, 1980). Além de menor I_s e I_c , as folhas dos estratos inferiores apresentaram, ainda, menor massa foliar específica (não mostrado), maior concentração de clorofila por unidade de massa e menor ângulo foliar, modificações típicas de folhas de ambientes sombreados (DaMatta, 2004c).

Para se protegerem de irradiância em níveis potencialmente injuriosos, as plantas podem desenvolver atributos para minimizar a exposição e/ou mesmo a absorção da energia radiante, via, por exemplo, aumentos do ângulo foliar e/ou diminuição da concentração de clorofilas, dentre outros. Esses atributos, combinados ou não, podem ter impactos profundos

na fotoproteção das plantas (Björkman & Demming-Adams, 1995). As folhas da face oeste, particularmente as do estrato superior, exibiram maior inclinação foliar, que seria uma vantagem por reduzir a interceptação de excesso de luz por unidade de área nas horas de maior elevação solar (Jiang et al., 2006; Falster & Westoby, 2003). Porém, no período da tarde, conquanto não ocorreu alteração na inclinação foliar, a declinação natural do sol faria com que essas folhas interceptassem luz em maior intensidade, uma vez que receberiam luz perpendicularmente, o que pôde ser observado a partir das 13:00 h (Figura 1). A não-alteração do ângulo foliar, ao longo do dia, pode indicar que tal atributo seja determinado pelas condições ambientes durante a formação e expansão da folha, conforme observado em eucalipto, no qual os ângulos azimutal e de inclinação da folha são determinados pela disponibilidade e direcionalidade da luz durante o crescimento (James & Bell, 2000). Por outro lado, a pouca habilidade de modificação da inclinação foliar, durante o dia, poderia ser, pois, uma desvantagem para as plantas, uma vez que menor seria a capacidade de interceptação de luz quando em menor intensidade (Falster & Westoby, 2003). Em todo caso, Chaves (2005) observou que folhas de café aumentaram seu ângulo de inclinação ao longo do dia nas horas mais quentes em dias de verão, mas não em dias de inverno.

Em paralelo ao maior ângulo de inclinação foliar, a redução da concentração de clorofilas, nas folhas dos estratos superiores, deve ter auxiliado na redução da absorptância foliar e, pois, reduzido a quantidade total de energia efetivamente absorvida pelos fotossistemas. As reduções na concentração de clorofilas podem estar associadas a processos fotooxidativos (Krause, 1988) ou com alterações na organização dos fotossistemas, de modo a servir como um mecanismo fotoprotetor (Elvira et al., 1998, Ottander et al., 1995), prevenindo uma fotodestruição severa do cloroplasto. Ademais, a constância da razão clorofila *a*/ clorofila *b*, independentemente de faces ou estratos, sugere um investimento proporcional de nitrogênio nos complexos coletores de luz (Lambers et al., 1998). No entanto, a redução da razão clorofilas totais/ nitrogênio total, em folhas dos estratos superiores, pode indicar uma redução na quantidade de nitrogênio alocada naqueles complexos, possivelmente, devido à maior disponibilidade de luz às folhas dos estratos superiores.

Independentemente da localização das folhas nas faces ou estratos, não foi observado decréscimos em *A* até cerca de $1400 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 3), conforme já relatado por Ramalho et al. (2000). Isso pressupõe que o café tenha mecanismos eficientes para dissipar, por vias fotoquímicas ou não-fotoquímicas, o excesso da energia radiante incidente. De fato, neste trabalho, as folhas dos diferentes estratos e faces comportaram-se de forma similar na utilização fotoquímica e não-fotoquímica da RFA, conforme já observado por Chaves (2005), trabalhando com plantas de café cultivadas a pleno sol ou sob 50% de sombra.

Independente de face analisada, o aumento de NPQ, na medida em que RFA foi incrementada (Figura 6), indica que uma fração da radiação absorvida foi dissipada termicamente (Maxwell & Johnson, 2000). Contudo, em irradiâncias elevadas, folhas de ambas as faces utilizaram menor proporção de energia radiante nas reações fotoquímicas, aumentando P_E . Isso sugere, pelo menos em condições de curta exposição a altas irradiâncias, que a capacidade de utilização fotoquímica pode ser menor que a capacidade de dissipação térmica, acarretando, por conseguinte, um aumento em P_E , fato que poderia levar à ocorrência de danos fotoinibitórios ou fotooxidativos (Chaves, 2005). Entretanto, outros mecanismos parecem importantes na dissipação do excesso de energia, uma vez que, em condições de campo, as folhas da face oeste, mesmo com a elevação de NPQ, apresentaram elevado P_E a partir das 12:00 h, sem, contudo, haver danos celulares consideráveis em folhas dessa face, em relação às da face leste. Concomitantemente, estes dados suportam a asserção de que o cafeeiro, apesar de sua origem em ambientes sombreados, apresenta uma plasticidade relativamente elevada de sua maquinaria fotossintética às variações da irradiância (DaMatta, 2004b, c; DaMatta & Rena, 2002). A aparente contradição entre a origem de sombra e tal plasticidade poderia ser explicada, considerando-se que, pelo menos no Brasil, as cultivares de café atualmente plantadas foram selecionadas em ensaios de competição conduzidos a pleno sol, sob espaçamentos largos e, portanto, tais cultivares podem, potencialmente, apresentar maior capacidade de aclimação/adaptação a altas irradiâncias (DaMatta, 2004c).

Foram observados, nas folhas da face oeste, baixos valores para F_v/F_m , associados com menores valores de F_m , e manutenção de F_0 , mesmo na antemanhã, especialmente em folhas do estrato superior. Estes dados sugerem a ocorrência de uma discreta fotoinibição crônica, na medida em que não se observou recuperação da eficiência fotoquímica máxima do FSII na antemanhã, fato, porém, exclusivo a folhas da face oeste, e de maior amplitude no estrato superior. Chaves (2005) e DaMatta et al. (1997) também observaram fotoinibição crônica em plantas de café em condições de temperaturas noturnas relativamente baixas. A base teórica que explicaria o decréscimo observado em F_m , sem, contudo, haver variação de F_0 , pode ser descrita pelo aumento na dissipação térmica proporcionada pela desativação de centros de reação do FSII (Bertamine & Nedunchezian, 2003; Greer, 1995; Havaux, 1994). Isso não impede que fotodanos tenham ocorrido nos centros de reação de FSII, considerando-se a constância de F_0 , que pode ser interpretada como um balanço entre dois processos opostos: aumento de F_0 , conseqüência de danos fotoinibitórios, e queda de F_0 , resultante de fotoproteção (Greer, 1995; Osmond, 1994; Franklin et al., 1992). De acordo com Martínez-Ferri et al. (2004), a ocorrência de fotoinibição crônica em espécies da Europa mediterrânea seria uma conseqüência de baixas temperaturas combinadas com elevada irradiância, que

induziriam a manutenção de altas concentrações de zeaxantina durante o período noturno, e, também, devido ao efeito cumulativo de fotodanos. Segundo García-Plazaola et al. (1999), a retenção de zeaxantina durante a noite não seria restrita a condições extremas de inverno, mas poderia ser, provavelmente, uma resposta geral de árvores sempre-verdes, mesmo em regiões com invernos amenos, como seria o da região de Viçosa (Chaves, 2005). Apesar de não ter ocorrido nenhuma diferença na concentração de carotenóides entre folhas das faces leste e oeste, a simples alteração na composição de carotenóides nas folhas mais expostas a períodos prolongados de alta irradiância, via operação do ciclo das xantofilas, poderia ser importante no aumento da capacidade de dissipação da energia de excitação (Tausz et al., 2004; Lambers et al., 1998; Demmig-Adams & Adams, 1992). Resta investigar, pois, se a exposição a períodos prolongados de irradiância em excesso das folhas da face oeste estaria efetivamente envolvida na alteração da composição de carotenóides responsáveis pelo aumento na dissipação de energia luminosa. De qualquer forma, a baixa taxa fotossintética, combinada com a elevada RFA_i pelas folhas dos estratos da face oeste, no período da tarde, muito além da saturação da fotossíntese, foram, possivelmente as causas da variação espacial da fotoinibição crônica observada nas folhas de café, sob condições de campo.

Apesar de Φ_{FSII} e q_p haverem diminuídos à tarde, nas folhas da face oeste (Figura 5), TTE permaneceu elevada, principalmente em virtude de RFA_i ter sido muito alta, que compensou os decréscimos daqueles parâmetros. Conseqüentemente, em virtude do desequilíbrio entre a absorção e utilização de RFA (TTE foi elevada significativamente, enquanto A permaneceu praticamente constante), uma maior pressão de excitação ocorreu nas folhas da face oeste, que apresentaram, pois, capacidade muito maior de geração de poder redutor e ATP, relativamente à das folhas da face leste. Uma vez que $1 - q_p$ é uma medida do estado de redução do aceptor primário de elétrons no FSII (Q_A) (Krause & Weis, 1991), pode-se sugerir que, no período da tarde, sob maior estresse luminoso, a re-oxidação de Q_A foi menos efetiva nas folhas da face oeste, acarretando uma maior fração dos centros de reação do FSII 'fechados'. Esses centros representam uma fração do FSII que está propensa a sofrer danos fotoinibitórios por excesso de excitação (Mohotti & Lawlor, 2002; Maxwell & Jasieniuk, 2000). Não obstante, neste trabalho, apenas uma modesta fotoinibição dinâmica, caracterizada por uma pequena queda de F_v/F_m , no período da tarde, no estrato inferior da face oeste, foi identificada. Conseqüentemente, isso não deve estar associado a fotodanos, mas à eficiente dissipação de energia não-radiativa observada, provavelmente por mecanismos rapidamente reversíveis intrínsecos ao FSII, e.g. via ciclo das xantofilas (Martínez-Ferri et al., 2004; Niinemets & Kull, 2001; Demmig-Adams et al., 1996; Long et al., 1994; Demmig-Adams & Adams, 1992). Com efeito, o decréscimo de F_v'/F_m' observado em folhas da face oeste, que poderia indicar a

ocorrência de fotoinativação do FSII (Martínez-Ferri et al., 2004), ocorreu em paralelo a um aumento expressivo de NPQ, indicando elevação na dissipação de calor, fato de grande importância na proteção da maquinaria fotossintética contra os efeitos deletérios do excesso de luz (Jiang et al., 2006; Tambussi et al., 2004; Behera & Choudhury, 2003). Por conseguinte, a fotoinibição dinâmica aqui observada pode ser encarada como uma estratégia de aclimatação do FSII, traduzindo-se em proteção contra níveis de luz potencialmente injuriosos (Asada, 1999; Osmond, 1994), como aqueles aos quais as folhas da face oeste da copa estavam submetidas.

O excesso de energia luminosa não utilizado para a fixação de CO₂, no ciclo de Calvin, deve ser dissipado, para evitar a formação excessiva de ERO's, que levaria ao estresse oxidativo (Apel & Hirt, 2004; Asada, 1999; Noctor & Foyer, 1998). Quando a capacidade de dissipação do excesso de energia de excitação é saturada, a atuação eficiente do sistema enzimático antioxidativo pode ser de fundamental importância na proteção celular, limitando a ocorrência do estresse oxidativo. Neste trabalho, porém, a atividade das enzimas antioxidativas pouco diferiu entre tratamentos. Deve-se destacar, contudo, que a atividade da SOD foi maior nas folhas dos estratos superiores do dossel, mas sem aumentos correspondentes da atividade da CAT e da APX, o que pode, pelo menos em parte, explicar o maior acúmulo de H₂O₂ nas folhas dos estratos superiores.

O aumento, ou pelo menos, a manutenção da atividade da SOD e da GPX observado nos diferentes tratamentos, na medida em que o estresse oxidativo foi potencializado, seria um mecanismo importante de defesa contra o estresse oxidativo. Porém, isso foi, de modo geral, acompanhado de reduções nas atividades da APX e CAT, sugerindo, pelo menos em parte, uma ação ineficiente do sistema enzimático, no sentido de promover proteção celular adequada. Aumentos nas atividades de SOD, paralelamente à redução das atividades de CAT e de APX, em resposta ao estresse oxidativo induzido por PQ, também foi observado por Oliveira (2005), trabalhando com dois clones de *C. canephora*. Em todo caso, a maior redução da eficiência fotoquímica nas folhas dos estratos da face oeste, quando se induziu o estresse oxidativo com PQ (Figura 10), não deve estar relacionada a uma atividade enzimática diferencial nessa face, mas, sim, com a menor eficiência fotoquímica que as folhas já manifestavam em condições de campo. Outrossim, devido às enzimas do estresse oxidativo, de modo geral, terem apresentado atividade semelhante entre folhas das duas faces, as folhas localizadas na face oeste da copa, por estarem submetidas a um maior estresse luminoso, parecem sujeitas de forma mais marcante ao estresse oxidativo. Mesmo assim, não foram observados danos celulares em folhas da face oeste, sugerindo que outros sistemas de fotoproteção, *e.g.*, ciclo das xantofilas e fotorrespiração, possam ter grande importância na

proteção da maquinaria fotossintética das folhas dessa face, quando expostas à elevada irradiância.

5.0 - CONCLUSÕES

Ainda que as taxas fotossintéticas tenham sido sobretudo baixas, e a RFA_i ter variado apreciavelmente no dossel, observou-se apenas uma discreta fotoinibição crônica, particularmente nas folhas que interceptam RFA em maior extensão. Ademais, poucas foram as diferenças na capacidade antioxidativa enzimática, na concentração de pigmentos fotossintéticos e na magnitude de danos celulares, quando foram comparadas folhas de ambientes lumínicos distintos. Isso sugere que o café, apesar de sua origem em ambientes sombreados, seja uma espécie com plasticidade consideravelmente elevada de sua maquinaria fotossintética às variações da irradiância, dissipando satisfatoriamente, por vias fotoquímicas ou não-fotoquímicas, o excesso da energia absorvida.

6.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEL K, HIRT H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plan. Biol.*, 55, 373-399.

ASADA K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 601-639.

BABBS CF, PHAM JA, COOLBAUGH RC. 1989. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol.*, 90, 1267-1270.

BARTH C, KRAUSE GH, WINTER K. 2001. Response of photosystem I compared with photosystem II to high-light stress in tropical shade and sun leaves. *Plant Cell Environ.*, 24, 163-176.

BAUER H, WIERER R, HATHEWAY H, LARCHER W. 1985. Photosynthesis of *Coffea arabica* after chilling. *Physiol. Plant.*, 64, 449-454.

BEHERA RK, CHOUDHURY NK. 2003. High irradiance-induced changes in carotenoid composition and increase in non-photochemical quenching of Chl *a* fluorescence in primary wheat leaves. *J. Plant Physiol.*, 160, 1141-1146.

BERTAMINI M, NEDUNCHEZHIAN N. 2003. Photoinhibition of photosynthesis in mature and young leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Sci.*, 164, 635-644.

BJÖRKMAN O, DEMMIG B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489-504.

BJÖRKMAN O, DEMMIG-ADAMS B. 1995. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: SCHULZE E-D, CALDWELL MM (Eds). *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 17-47.

CAKMAK I, HORST J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.*, 83, 463-468.

CATALDO DA, HAROON M, SCHRADER LE, YOUNGS VL. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 6, 71-80.

- CHAVES ARM. 2005. *Fotossíntese e mecanismos de proteção contra estresse fotooxidativo em Coffea arabica L., cultivado em condições de campo sob dois níveis de irradiância*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal). 36 p.
- DaMATTA FM. 2003. Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: HEMANTARANJAN E (Ed). *Advances in plant physiology*, v.5, Scientific Publishers, Jodhpur, pp. 227-265.
- DaMATTA FM. 2004a. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Braz. J. Plant Physiol.*, 16, 1-6.
- DaMATTA FM. 2004b. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Res.*, 86, 99-114.
- DaMATTA FM. 2004c. Fisiologia do cafeeiro em sistemas arborizados. In: MATSUMOTO SN (Ed). *Arborização de cafezais no Brasil*. Empresa Gráfica da Bahia, Salvador, pp. 87-107.
- DaMATTA FM, MAESTRI M. 1997. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Photosynthetica*, 34, 439-446.
- DaMATTA FM, MAESTRI M, MOSQUIM PR, BARROS RS. 1997. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. *Plant Sci.*, 128, 43-50.
- DaMATTA FM, RENA AB. 2002. Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno sol. In: ZAMBOLIM L (Ed). *O estado de arte de tecnologias na produção de café*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp. 93-135.
- DEMMIG-ADAMS B, ADAMS III WW. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 599-626.
- DEMMIG-ADAMS B, ADAMS III WW, BAKER DH, LOGAN BA, BOWLING DR, VERHOEVEN AS. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol. Plant.*, 98, 253-264.
- EGGERT A, HASSELT PRV, BREEMAN AM. 2003. Chilling-induced photoinhibition in nine isolates of *Valonia utricularis* (Chlorophyta) from different climate regions. *J. Plant Physiol.*, 160, 881-891.
- ELVIRA R, ALONSO S, CASTILHO J, GIMENO BS. 1998. On the response of pigments and antioxidants of *Pinus halepensis* seedlings to Mediterranean climatic factors and long-term ozone exposure. *New Phytol.*, 138, 419-432.
- EVANS J. 1993. Photosynthetic acclimation and nitrogen partitioning within a Lucerne canopy. II. Stability through time and comparison with a theoretical optimum. *Aust. J. Plant Physiol.*, 20, 69-82.
- FALSTER DS, WESTOBY M. 2003. Leaf size and angle vary widely across species: what consequences for light interception? *New Phytol.*, 158, 509-525.
- FERRIS R, NIJS I, BEHAEGHE T, IMPENS I. 1996. Elevated CO₂ and temperature have different effects on leaf anatomy of perennial ryegrass in spring and summer. *Ann. Bot.*, 78, 489-497.

- FRANKLIN LA, LEVAVASSEUR G, OSMOND CB, HENLEY WJ, RAMUS J. 1992. Two components of onset and recovery during photoinhibition of *Ulva rotundata*. *Planta*, 183, 339-408.
- FRYER MJ, OXBOROUGH B, MARTIN B, ORT DR, BAKER NR. 1995. Factors associated with depression of photosynthetic quantum efficiency in maize at low growth temperature. *Plant Physiol.*, 108, 761-767.
- GARCÍA-PLAZAOLA JI, ARTETXE U, BECERRIL JM. 1999. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L) during winter. *Plant Sci.*, 143, 125-133.
- GARCÍA-PLAZAOLA JI, FARIA T, ABADÍA A, CHAVES MM, PEREIRA JS. 1997. Seasonal changes in xanthophylls composition and photosynthesis of cork oak (*Quercus suber* L.) leaves under Mediterranean climate. *J. Exp. Bot.*, 48, 1667-1674.
- GENTY B, BRIANTAIS JM, BAKER NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 990, 87-92.
- GIANNOPOLITIS CN, RIES SK. 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, 59, 309-314.
- GILMORE AM. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.*, 99, 197-209.
- GREER DH. 1995. Effect of canopy position on the susceptibility of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves on vines in an orchard environment to photoinhibition throughout the growing season. *Aust. J. Plant Physiol.*, 22, 299-309.
- HALDIMANN P, FRANCHEBOUD Y, STAMP P. 1996. Photosynthetic performance and resistance to photoinhibition of *Zea mays* L. leaves grown at sub-optimal temperature. *Plant Cell Environ.*, 19, 85-92.
- HAVAUX M. 1994. Temperature-dependent modulation of the photoinhibition-sensitivity of photosystem II in *Solanum tuberosum* leaves. *Plant Cell Physiol.*, 35, 757-766.
- HAVIR EA, MCHALE NA. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.*, 84, 450-455.
- HAYDEN DB, BAKER NR. 1990. Damage to photosynthetic biomembranes in chilling sensitive plants: maize, a case study. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 9, 321-341.
- HURNER NPA, MAXWELL DP, GRAY GR, SAVITCH LV, KROL M, IVANOV AG, FALK S. 1996. Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: redox state of photosystem II. *Physiol. Plant.*, 98, 358-364.
- IIO A, FUKASAWA H, NOSE Y, KATO S, KAKUBARI Y. 2005. Vertical, horizontal and azimuthal variations in leaf photosynthetic characteristics within a *Fagus crenata* crown in relation to light acclimation. *Tree Physiol.*, 25, 525-536.
- ISHIDA A, NAKANO T, MATSUMOTO Y, SAKODA M, ANG LH. 1999. Diurnal changes in leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in tropical tree species with contrasting light requirements. *Ecol. Res.*, 14, 77-88.

- JACKSON ML. 1958. *Soil chemical analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 498p.
- JAMES SA, BELL DT. 2000. Leaf orientation, light interception and stomatal conductance of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* leaves. *Tree Physiol.*, 20, 815-823.
- JIANG C-D, GAO H-Y, ZOU Q, JIANG G-M, LI L-H. 2006. Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. *Environ. Exp. Bot.*, 55, 87-96.
- KRAUSE GH. 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.*, 74, 566-574.
- KRAUSE GH, WEIS E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 313-249.
- KUMAR D, TIESZEN LL. 1980. Photosynthesis in *Coffea arabica*. I. Effects of light and temperature. *Exp. Agric.*, 16, 13-19.
- LAMBERS H, CHAPIN III FS, PONS TL. 1998. *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag, New York, 539 p.
- LANDSBERG JJ. 1986. *Physiological ecology of forest production*. Academic Press, Orlando, 198 p.
- LEE DH, LEE CB. 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.*, 159, 78-85.
- LICHTENTHALER HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzimol.*, 148, 350-382.
- LIMA ALS, DaMATTa FM, PINHEIRO HA, TÓTOLA MR, LOUREIRO ME. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 47, 239-247.
- LONG SP, HUMPHRIES S, FALKOWSKI PG. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 633-662.
- LOVELOCK CE, WINTER K. 1996. Oxygen-dependent electron transport and protection from photoinhibition in leaves of tropical tree species. *Planta*, 198, 580-587.
- MALAVOLTA P, FERNANDES DR, ROMERO JP. 1993. *Encarte técnico: seja doutor do seu cafezal*. Arquivo do Agrônomo, n.3, Potafos, Piracicaba, 12p.
- MARTÍNEZ-FERRI E, MANRIQUE E, VALLADARES F, BALAGUER L. 2004. Winter photoinhibition in the field involves different processes in four co-occurring Mediterranean tree species. *Tree Physiol.*, 24, 981-990.
- MASCHER R, LIPPMANN B, HOLZINGER S, BERGMANN H. 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci.*, 163, 961-969.
- MAXWELL BD, JASIENIUK M. 2000. The evolution of herbicide resistance evolution models. 3rd *International Weed Science Congress Abstracts*, Foz do Iguaçu, Brazil. 80 p.

- MAXWELL K, JOHNSON GN. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51, 659-668.
- MOHOTTI AJ, LAWLOR DW. 2002. Diurnal variation of photosynthesis and photoinhibition in tea: effects of irradiance and nitrogen supply during growth in the field. *J. Exp. Bot.*, 53, 313-322.
- NAGALAKSHMI N, PRASAD MNV. 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci.*, 160, 291-299.
- NAKANO Y, ASADA K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22, 867-880.
- NIINEMETS Ü, KULL O. 2001. Sensitivity of photosynthetic electron transport to photoinhibition in a temperate deciduous forest canopy: Photosystem II center openness, non-radiative energy dissipation and excess irradiance under field conditions. *Tree Physiol.*, 21, 899-914.
- NIYOGI KK. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 333-359.
- NOCTOR G, FOYER CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 249-279.
- O'KANE D, GILL V, BOYD P, BURDON R. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta*, 198, 371-377.
- OLIVEIRA GMR. 2005. *Estresse oxidativo mediado por paraquat e clonagem do gene da dismutase do superóxido (Cu/Zn-SOD) em Coffea canephora*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal). 80 p.
- ORT DR, BAKER NR. 2002. A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 193-198.
- OSMOND CB. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: BAKER NR, BOWYER JR (Eds). *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 1-24.
- OSÓRIO ML, BREIA E, RODRIGUES A, OSÓRIO J, ROUX XL, DAUDET FA, FERREIRA I, CHAVES MM. 2006. Limitations to carbon assimilation by mild drought in nectarine trees growing under field conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 55, 235-247.
- OTTANDER C, CAMPBELL D, ÖQUIST G. 1995. Seasonal changes in photosystem II organization and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta*, 197, 176-183.
- PANDEY DM, KANG K-H, YEO U-D. 2005. Effects of excessive photon on the photosynthetic pigments and violaxanthin de-epoxidase activity in the xanthophylls cycle of spinach leaf. *Plant Sci.*, 168, 161-166.
- PEÑA-VALDIVIA CB, PERALES-RIVERA HR, LAGUNES-ESPINOZA LC. 1994. Chilling effects on leaf photosynthesis and seed yields of *Phaseolus vulgaris*. *Can. J. Bot.*, 72, 1403-1411.

- PINHEIRO HA, DaMATTA FM, CHAVES ARM, FONTES EPB, LOUREIRO ME. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Sci.*, 167, 1307-1314.
- RABINOWITCH HD, CLARE DA, CRAPO JD, FRIDOVICH I. 1983. Positive correlation between superoxide dismutase and resistance to Paraquat toxicity in the green algae *Chlorella sorokiniana*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 225, 640-648.
- RAMALHO JC, PONS TL, GROENEVELD HW, AZINHEIRA HG, NUNES MA. 2000. Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Aust. J. Plant Physiol.*, 27, 43-51.
- RUSSELL AW, CRITCHLEY C, ROBINSON SA, FRANKLIN LA, SEATON GGR, CHOW WS, ANDERSON JM, OSMOND CB. 1995. Photosystem II regulation and dynamics of the chloroplast D1 protein in Arabidopsis leaves during photosynthesis and photoinhibition. *Plant Physiol.*, 107, 943-952.
- SCHARBERG PG, WILKINSON RC, SHANE RC, DONNELLY JR, CALI PF. 1995. Winter photosynthesis of red spruce from three Vermont seed sources. *Tree Physiol.*, 15, 345-350.
- SIGMAPLOT. 2004. *For windows, version 9.01*. Copyright©, 2004, Systat Software.
- SILVA EA, DaMATTA FM, DUCATTI C, REGAZZI AJ, BARROS RS. 2004. Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis in Arabica coffee trees. *Field Crops Res.*, 89, 349-357.
- SISTEMA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GENÉTICAS – SAEG. 1997. versão 7.1. Viçosa, MG, Fundação Arthur Bernardes.
- SMIRNOFF N. 1995. Antioxidant systems and response to the environment. In: SMIRNOFF N (Ed). *Environment and plant metabolism – flexibility and acclimation*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 217-243.
- TAMBUSSI EA, BARTOLI CG, GUIAMET JJ, BELTRANO J, ARAUS JL. 2004. Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. *Plant Sci.*, 167, 19-26.
- TAUSZ M, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ AA, WONISCH A, PETERS J, GRILL D, MORALES D, JIMÉNEZ MS. 2004. Photostress, photoprotection, and water soluble antioxidants in the canopies of five Canarian laurel forest tree species during a diurnal course in the field. *Flora*, 199, 110-119.
- THIELE A, SCHIRWITZ K, KRAUSE GH. 1996. Increased xanthophyll cycle activity and reduced D₁ protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Sci.*, 115, 237-250.
- YU Q, RENGEL Z. 1999. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutase in narrow-leaved lupines. *Plant Sci.*, 142, 1-11.