

AGNALDO RODRIGUES DE MELO CHAVES

FOTOSSÍNTESE E MECANISMOS DE PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSE
FOTOOXIDATIVO EM *Coffea arabica* L., CULTIVADO EM CONDIÇÕES DE
CAMPO SOB DOIS NÍVEIS DE IRRADIÂNCIA

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

2005

AGNALDO RODRIGUES DE MELO CHAVES

FOTOSSÍNTESE E MECANISMOS DE PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSE
FOTOOXIDATIVO EM *Coffea arabica* L., CULTIVADO EM CONDIÇÕES DE
CAMPO SOB DOIS NÍVEIS DE IRRADIÂNCIA

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 em: 22 de fevereiro de 2005

Prof^ª. Hermínia E. P. Martinez
(Conselheira)

Prof. Ricardo H. S. Santos

Dr. Hugo A. Pinheiro

Prof. Marco A. P. e Silva

Prof. Fábio Murilo Da Matta
(Orientador)

Aos meus pais, Sebastião e Vera Lúcia,

Aos meus familiares, Guilherme, Edvar, Geordânia,
Ingrid, Luís Guilherme, Lara, Gustavo, Reginaldo
e Marta

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e proteção durante minha vida e pela graça concedida para cumprir mais esta etapa, pois, enquanto durar, não deixará de haver sementeira e ceifa, frio e calor, verão e inverno, dia e noite.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e, com isso, dando suporte à realização do curso.

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

Ao Professor Fábio Murilo Da Matta, pela sua orientação e dedicação constante na realização deste trabalho.

Aos Professores Ermínia E. P. Martinez e Ricardo H.S Santos, do Departamento de Fitotecnia, pela cessão da área experimental para a realização deste trabalho, além da ajuda e participação na defesa da tese.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela amizade e conhecimentos a mim fornecidos.

Aos colegas do grupo café (Hugo, Cláudio, Roberto, Wagner, Paulo César, Ângela, Gustavo, Karine e Werner), pela amizade e o apoio na realização deste trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves nasceu em Lagoa Dourada-MG, Brasil, em 8 de outubro de 1973. Em março de 2003, concluiu seu curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Em março do mesmo ano, iniciou seus estudos no curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na mesma Instituição.

LISTAS DE ABREVIATURAS

A = taxa de assimilação líquida de carbono

APX = peroxidase do ascorbato

ASC = ascorbato

CAT = catalase

C_i/C_a = razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2

D = fração de irradiância dissipada termicamente

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

FSI = fotossistema I

FSII = fotossistema II

F_v/F_m = razão entre fluorescências variável e máxima

GR = redutase da glutatona

g_s = condutância estomática

I_s = irradiância de saturação

MDA = aldeído malônico

N = nitrogênio

P = fração de irradiância utilizada na fase fotoquímica do FSII

P_E = fração de irradiância não utilizada na fase fotoquímica do FSII e nem dissipada termicamente

RFA = radiação fotossinteticamente ativa

Rubisco = carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato

TTE = taxa de transporte de elétrons

T_f = temperatura foliar

SOD = dismutase do superóxido

δ_e = déficit de pressão de vapor entre o interior da folha e a atmosfera

Φ_{FSII} = rendimento quântico do transporte de elétrons

Ψ_{am} = potencial hídrico na antemanhã

CONTEÚDO

Resumo.....	1
Abstract.....	3
1 - Introdução.....	5
2 - Material e Métodos.....	9
a - Parâmetros agrometeorológicos.....	10
b - Potencial hídrico.....	10
c - Radiação interceptada pela folha e inclinação foliar.....	10
d - Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência.....	10
e - Atividades enzimáticas.....	12
f - Ascorbato e desidroascorbato.....	12
g - Danos celulares.....	12
h - Pigmentos.....	13
i - Nitrogênio total.....	13
3 - Resultados.....	13
a - Potencial hídrico.....	13
b - Ambiente.....	13
c - Trocas gasosas.....	15
d - Fluorescência e fotoinibição.....	15

e - Pigmentos e nitrogênio total.....	16
f - Ângulo foliar, rendimento quântico de transporte de elétrons e taxa de transporte de elétrons.....	19
g - Utilização fotoquímica e dissipação não-fotoquímica da irradiância actínica.....	20
h - Sistema antioxidativo.....	22
i - Danos celulares.....	24
4 - Discussão.....	24
5 - Conclusões.....	30
5 - Referências.....	31

RESUMO

CHAVES, Agnaldo Rodrigues de Melo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Fotossíntese e mecanismos de proteção contra estresse fotooxidativo em *Coffea arabica* L., cultivado em condições de campo sob dois níveis de irradiância.** Orientador: Fábio Murilo Da Matta. Conselheiros: Hermínia Emília Prieto Martinez e Marcelo Ehlers Loureiro.

O cafeeiro é originário de ambientes sombreados, fato gerador de uma crença bem estabelecida de que se trata de uma espécie de sombra. No entanto, em muitos locais, o café é cultivado a pleno sol, com produções satisfatórias. O objetivo deste trabalho foi, pois, identificar potenciais mecanismos de fotoproteção, bem como avaliar como eles se ajustam diurna e sazonalmente. As plantas foram cultivadas no campo, sob dois níveis de irradiância (50 e 100% da luz natural incidente), analisando-se folhas das faces do renque completamente expostas à luz, em três épocas contrastantes: agosto e dezembro de 2003 e outubro de 2004. A fotossíntese líquida e a condutância estomática apresentaram valores baixos e similares nas plantas de ambos regimes de luz em todas as épocas, especialmente à tarde. Tendência semelhante foi observada para a atividade da carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato, amostrada ao meio-dia. Observou-se fotoinibição crônica em agosto e uma discreta fotoinibição dinâmica em dezembro e em outubro nas plantas de ambos tratamentos. As concentrações de clorofilas e carotenóides totais foram menores em agosto nas plantas de ambos regimes de luz. O ângulo foliar foi sempre maior nas plantas a pleno sol em relação às sob sombra. Na maioria das amostragens, a taxa de transporte de elétrons foi semelhante em plantas de ambos tratamentos. Em laboratório, observou-se, na medida em que incrementava a irradiância, redução na fração de energia utilizada na fase fotoquímica da fotossíntese e aumentos concomitantes e consistentes na fração dissipada

na forma de calor e na fração da energia não utilizada na fase fotoquímica e tampouco dissipada como calor. Isto foi observado até a irradiância actínica de $1500 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sem, contudo, verificar-se um padrão claro entre plantas a pleno sol e sob sombra. Não se observaram diferenças entre essas plantas acerca das atividades das enzimas antioxidantes: dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutathione (GR). Comparativamente, maior atividade da SOD e da APX ocorreram em outubro, da CAT, em outubro/dezembro, enquanto a da GR foi similar entre as épocas avaliadas. Verificou-se tendência de maiores níveis de ascorbato nas plantas a pleno sol que naquelas sob sombra, mas apenas em agosto tais diferenças foram significativas. De modo geral, danos celulares de pequena magnitude, caracterizados por aumentos discretos no extravasamento de eletrólitos e acúmulo de aldeído malônico, foram mais evidentes em agosto e em outubro em relação a dezembro, embora similar entre plantas de ambos tratamentos. Em suma, nas condições deste experimento, o cafeeiro apresentou alta plasticidade fisiológica de seu aparelho fotossintético às variações da irradiância.

ABSTRACT

CHAVES, Agnaldo Rodrigues de Melo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2005. **Photosynthesis and mechanisms of protection against photooxidative stress in *Coffea arabica* L. grown in the field under two irradiance levels.** Advisor: Fábio Murilo Da Matta. Committee members: Hermínia Emília Prieto Martinez, Marcelo Ehlers Loureiro.

Coffee is native to shady environments, a fact that has been associated with a general belief that it is a shade species. However, in many places, coffee grows well without shade and even out-yields shaded coffee. The aim of this work was to identify potential mechanisms of photoprotection as well as to evaluate how they are able to adjust diurnally and seasonally. The plants were grown in the field under two irradiance levels (50 and 100% of incident natural light). Sampling and measurements were made using outer leaves from the sun-faced sides of the coffee hedgerow in three contrasting times: August and December 2003 and October 2004. Regardless of the treatments, net photosynthesis and stomatal conductance were very low, particularly in the afternoon. A similar trend was observed for the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, as analyzed at midday. Chronic photoinhibition was found in August, whereas a slight, dynamic photoinhibition was observed in December and October, irrespective of light treatments. Concentrations of chlorophylls and total carotenoids were smaller in August than in December or October, regardless of light conditions. Leaf angle was always steeper in plants under full sunlight in relation to those under shade. On most occasions, electron transport rate was similar in plants under both irradiance treatments. Under laboratory conditions, there was a reduction in the fraction of absorbed light used in photochemistry which was accompanied by increases in the fraction

of absorbed light dissipated as heat as well as in that fraction neither used in photochemistry nor dissipated thermally. This was observed until applying an actinic irradiance of $1500 \mu\text{mol (photons) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, but no clear difference between sun leaves and shaded ones was noted, however. Activities of key antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR), were similar between plants from both light treatments. Comparatively, larger activity of SOD and APX occurred in October, that of CAT in October/December, while GR activity was similar among the evaluated periods. A trend for higher reduced ascorbate pool was observed in plants grown in the open than in those grown under shade, but only in August such differences reach statistical significance. In a general way, discrete cellular damages, characterized by slight increases both in electrolyte leakage and malondialdehyde accumulation, were more evident in August and in October as compared to December, but such damages were similar between plants from both irradiance treatments. Summing up, the photosynthetic apparatus of the coffee tree, under the present experimental conditions, showed a high physiological plasticity to varying irradiance.

1 - INTRODUÇÃO

Dentre cerca de 100 espécies de *Coffea* descritas (Fazuoli 1986), *C. arabica* L. (café Arábica) e *C. canephora* Pierre (café Robusta) são as únicas com expressão econômica no mercado mundial. Atualmente, cerca de 62% do café negociado em bolsas refere-se a Arábica, e os 38% restantes, a Robusta.

O café Arábica é originário das florestas tropicais da Etiópia (África), onde é encontrado em estado espontâneo como vegetação de sub-bosque e desenvolve-se, portanto, permanentemente sob sombra. Assim, os primeiros cafezais eram instalados sob sombra, numa tentativa de reproduzir-se, dentre certos limites, na lavoura, as condições ecológicas presumivelmente mais adequadas à espécie. Não obstante, cafeeiros cultivados a pleno sol produzem satisfatoriamente e, na maioria dos casos, mais que os plantios à sombra. Como consequência, o sombreamento, como uma prática cultural regular, foi abandonado em várias regiões do mundo, como no Brasil e no Quênia (Malavolta 2000).

O termo arborização é empregado para indicar um sombreamento esparsos, até, no máximo, cerca de 50% de cobertura do terreno. Apesar da grande controvérsia acerca dos efeitos presumivelmente positivos da arborização, tem-se observado um interesse renovado em sua adoção no cultivo do café, particularmente porque essa prática está associada à conservação de recursos do ambiente e menor quantidade de insumos para uma produção sustentável de café (Beer *et al.* 1998, DaMatta e Rena 2002). A literatura é farta em exemplos demonstrando incrementos, decréscimos ou invariabilidade da produção do café, em função da arborização. Três fatores podem concorrer, pelo menos teoricamente, para a redução da produção, na medida em que se aumenta a extensão da arborização: (i) menor assimilação do carbono pela planta inteira, sob condições de arborização excessiva; (ii) maior estímulo à emissão de gemas vegetativas em detrimento das gemas florais (Cannell 1975); e (iii) redução do número de nós produzidos por ramo (Castillo e López 1966).

Considerando-se que o número de nós formado seja o principal componente da produção do café (Cannell 1975), pode-se presumir que, aumentando-se a extensão da arborização, a produção decresceria, em razão do menor número de nós formados e do menor número de botões florais por nó, especialmente em locais com condições ambientes próximas às ótimas à cafeicultura. De qualquer modo, o uso de espécies arbóreas adequadas e sob densidades apropriadas parece não afetar, ou pode mesmo estimular, a produção do café (Baggio *et al.* 1997, Butler 1979, Caramori *et al.* 1995, Soto-Pinto *et al.* 2000). Ademais, a arborização pode reduzir sensivelmente as variações bienais da produção do café (Cannell 1985).

Apesar de a grande maioria dos trabalhos sugerir que o cafeeiro exibe folhas com características típicas de sombra, a sua taxa de fotossíntese líquida (A) pode ser maior a pleno sol que à sombra, desde que a abertura estomática não seja limitante (DaMatta e Rena 2002). Na maioria dos trabalhos em que se observa maior A sob sombra que a pleno sol, menor condutância estomática (g_s) para folhas expostas parece explicar, pelo menos em parte, essas observações (Freitas 2000, Kumar e Tieszen 1980, Paiva *et al.* 2001). Uma vez que a abertura dos estômatos em café é maior sob sombra ou em dias nublados ou chuvosos (Fanjul *et al.* 1985, Maestri e Vieira 1958), é plausível sugerir que, a pleno sol, a fotossíntese possa ser largamente limitada por baixos valores de g_s . Não obstante, é pouco provável que a alta irradiância, *per se*, acarrete fechamento estomático. Conforme Nunes (1988), a temperatura e a umidade relativa do ar, mas não a irradiância, seriam os fatores ambientes mais importantes envolvidos na regulação estomática do cafeeiro.

Além de apresentar maior A em folhas de sol que em folhas sombreadas, particularmente sob condições não-estressantes, o cafeeiro pode exibir outras características indicativas de aclimação/adaptação às altas irradiâncias. Em plantas a pleno sol, observa-se, por exemplo, redução da área foliar específica, aumento da espessura da cutícula, incrementos na irradiância de saturação, cloroplastos com menos *grana* e menos tilacóide por *granum* (Fahl *et al.* 1994), aumento na quantidade e na atividade da rubisco (Ramalho *et al.* 1999) e reversão da fotoinibição relativamente rápida (DaMatta e Maestri 1997), todas características adaptativas à plena irradiância. Ressalta-se que, pelo menos no Brasil, as cultivares atualmente plantadas foram selecionadas em ensaios de competição conduzidos a pleno sol e, portanto, tais cultivares podem, potencialmente, apresentar adaptações a altas irradiâncias em extensão superior às de cultivares selecionadas para cultivos sombreados. No entanto, atributos típicos de folhas de sombra

permanecem, mesmo na folhagem exposta, como a baixa razão clorofila *a*/clorofila *b* (DaMatta e Maestri 1997, Fahl *et al.* 1994).

Irradiâncias superiores às necessárias para saturar a fotossíntese freqüentemente acarretam um decréscimo líquido na taxa de transporte de elétrons através do fotossistema II (FSII), e um forte incremento na taxa de giro de D₁, o principal polipeptídeo dos centros de reação do FSII (Andersson *et al.* 1994). Esse fenômeno, conhecido como fotoinibição, sempre resulta em perda de eficiência fotoquímica do FSII. No cafeeiro, uma vez que se atinja a irradiância de saturação (~600 μmol(fótons) m⁻² s⁻¹ em folhas expostas), a fotossíntese pode prosseguir sem decréscimos substanciais até cerca de 1200 μmol(fótons) m⁻² s⁻¹ (Kumar e Tieszen 1980), ou mesmo 1400 μmol(fótons) m⁻² s⁻¹ (Ramalho *et al.* 2000). Todavia, se a fotossíntese e a fotorrespiração não utilizarem a maior fração do poder redutor gerada na fase fotoquímica, poderá ocorrer uma sobre-redução da cadeia de transporte de elétrons do cloroplasto e, nessa condição, elétrons podem daí escapar e serem usados para reduzir o oxigênio molecular, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) potencialmente capazes de resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Lima *et al.* 2002, Pinheiro *et al.* 2004), popularmente conhecidos como escaldadura.

A fotoinibição da fotossíntese pode ser encarada como uma estratégia de aclimatação do FSII, traduzindo-se em proteção contra níveis de luz potencialmente injuriosos (Asada 1999). Assim, a fotoinibição, *per se*, pode não resultar em reduções substanciais na produtividade de cafeeiros cultivados em campo, o que explicaria, em parte, o sucesso do cultivo de variedades comerciais a pleno sol (DaMatta e Maestri 1997). Por outro lado, sob certas condições, os mecanismos de defesa da planta podem não ser suficientes para dissipar a energia excedente e, nesse caso, a ocorrência de fotodanos pode ser bastante expressiva. Dentre tais condições, podem-se destacar: adubação deficiente; carga pesada de frutos; déficit hídrico; baixas temperaturas, 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; ou qualquer outro fator que leve ao depauperamento da planta. Esses fatores, combinados ou não, podem acarretar uma seqüência de eventos potencialmente catastrófica, especialmente em cafezais que recebem a radiação solar da tarde. Como consequência visível, a escaldadura se manifesta, culminando na abscisão da folha. Nessas condições, a incidência de cercosporiose e ferrugem usualmente aumenta, também levando à abscisão foliar. Desse modo, não somente a folhagem exposta, mas também as folhas mais internas da copa, passam a

receber fluxo de fótons superior ao necessário para saturar a fotossíntese, o que potencializa mais ainda a abscisão das folhas. Em muitos casos, o ramo seca ou pouco cresce, acarretando quebra de produção na colheita seguinte. A arborização, nesse contexto, poderia minimizar, sobretudo, a ocorrência de escaldadura (DaMatta 2004a, DaMatta e Rena 2002).

Proteção contra danos oxidativos pode ocorrer às expensas de aumento na dissipação térmica da energia de excitação, por meio de carotenóides, ou via metabolismo das ERO's (e.g., peróxido de hidrogênio, oxigênio singleto, radical hidroxil), em função da maior atividade do sistema antioxidativo (Asada 1999). Tal sistema compreende as chamadas "enzimas antioxidantes" (e.g., dismutase do superóxido, SOD; catalase, CAT; peroxidase do ascorbato, APX e redutase da glutatona, GR), além da participação de moléculas antioxidantes hidrofílicas (e.g., ascorbato e glutatona) e lipofílicas (e.g., α -tocoferol, β -caroteno e carotenóides do ciclo das xantofilas) (Asada 1999, Ort e Baker 2002). Maior proteção contra excesso de irradiância pode também ocorrer via alteração do ângulo de orientação foliar, uma vez que, quanto mais verticalizada estiver a folha, menor será a interceptação da radiação incidente (DaMatta 2003). Além disso, o custo metabólico é sobretudo menor para alteração do ângulo foliar que para a síntese de moléculas antioxidantes ou para suportar o giro da maquinaria enzimática antioxidante (Liu *et al.* 2003).

Até o presente, nenhum estudo mais detalhado, em café, parece ter sido feito acerca da associação entre sombreamento, oscilações nos padrões de fotossíntese e mecanismos de fotoproteção. O objetivo deste trabalho foi, pois, identificar potenciais mecanismos de fotoproteção, bem como avaliar como tais mecanismos se ajustam diurna e sazonalmente, em café. Para tal, plantas adultas foram cultivadas sob sombra e a plena exposição solar, procedendo-se às avaliações em folhas mais externas, ao longo do dia. Foram avaliados as trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos, variações na interceptação da irradiância, utilização e dissipação da energia absorvida, o metabolismo antioxidante e danos celulares, em três épocas contrastantes: agosto de 2003, época fria e seca, caracterizada por taxas negligenciáveis de crescimento vegetativo e fotossíntese; dezembro de 2003, época quente e chuvosa, com taxas de crescimento e fotossíntese frequentemente limitadas pelas altas temperaturas; e em outubro de 2004, época chuvosa e de temperatura mais amena, quando se esperam taxas mais elevadas de crescimento vegetativo e fotossíntese (Silva *et al.* 2004).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em um campo experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (altitude 690 m; 20°45'S, 42°15'W), em Viçosa, 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). Na época mais fria, são comuns noites frias (temperaturas mínimas variando, tipicamente, de 5 a 12°C) seguidas de dias ensolarados, com temperaturas máximas facilmente excedendo 25°C.

Foram utilizadas plantas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho (CH 2077-2-5-99), cultivadas sob espaçamento de 3 x 1 m, plantadas em novembro de 1989, com uma planta por cova, em Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, com declividade do terreno de 40%, sendo o plantio orientado no sentido leste-oeste. Em agosto de 1998, as plantas foram recepadas e, então, conduzidas com dois ramos ortotrópicos, cada. Adubações e controle fitossanitário vêm sendo realizados conforme práticas agronômicas usuais recomendadas para a cultura. Foram avaliadas plantas a pleno sol e sob 50% de luz solar direta, sendo utilizado, para este tratamento, a partir de outubro de 2001, sombrite com a referida capacidade de retenção de luminosidade.

As medições e amostragens foram feitas em dias sem nuvens, com insolação superior a 9 h: 20 de agosto e 12 de dezembro de 2003, e 30 de outubro de 2004. Nessas datas, as temperaturas do ar mínima e máxima foram, respectivamente, 8,6 e 26,5 °C, 18,2 e 34,0°C, e 15,5 e 29,4°C. De 20 de maio a 20 de agosto de 2003, houve apenas 31 mm de precipitação, dos quais 22,5 mm ocorreram em 16 de agosto. Houve precipitação abundante nos dias precedentes às outras épocas de medições. Salienta-se, ainda, que ao longo da semana anterior a cada dia de avaliação, houve 53, 23 e 32 h de insolação, respectivamente em agosto, dezembro e outubro. Nas épocas selecionadas, folhas da face norte, em agosto, e da face sul, em outubro e dezembro, foram expostas à radiação solar incidente ao longo de todo o dia. Todas as medições e amostragens foram feitas em folhas expandidas do terço superior das plantas, utilizando-se apenas folhas das faces do renque do cafezal completamente expostas à radiação solar. Exceto quando explicitado em contrário, tecidos foliares foram amostrados em torno do meio dia, congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a -80°C até a análise.

O experimento foi disposto em blocos casualizados, com três repetições, avaliando-se duas das três plantas centrais em cada parcela, que foi constituída por uma fileira de cinco plantas. O experimento foi analisado em esquema fatorial (2x3, dois níveis de irradiância e três épocas). As comparações entre as médias dos tratamentos foram realizadas por meio dos testes *t* de Student e de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

a - Parâmetros agrometeorológicos

O déficit de pressão de vapor entre o interior da folha e a atmosfera (δe) foi calculado, utilizando-se das fórmulas descritas em Landsberg (1986). Para isso, foram tomadas, ao longo do período de avaliação das trocas gasosas, as temperaturas do ar (bulbo seco e bulbo úmido) e da folha, utilizando-se, respectivamente, de um psicrômetro e de um termopar associado à pinça de um fluorômetro modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). A radiação fotossinteticamente ativa (RFA) foi medida com um sensor também acoplado à pinça do fluorômetro. Alternativamente, RFA foi medida com um fotômetro/radiômetro (Li-185, Li-Cor, Nebraska, EUA). Outros dados meteorológicos, como precipitação e insolação, foram obtidos de uma estação meteorológica localizada a cerca de 2,5 km do campo experimental.

b - Potencial hídrico

O potencial hídrico foliar foi medido com uma bomba de pressão tipo Scholander, na antemanhã.

c - Radiação interceptada pela folha e inclinação foliar

A RFA interceptada por uma folha individual foi estimada, considerando-se os ângulos azimutal e de elevação solar, da declinação solar nas datas de amostragens, além dos ângulos azimutal e de inclinação foliar (Pearcy 1989). Três folhas externas recebendo radiação solar direta foram amostradas para a medição dos ângulos azimutal e de inclinação (Norman e Campbell 1989). A inclinação foliar foi medida em relação ao horizonte (= 0°).

d - Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência

Para estimarem-se os parâmetros fotossintéticos, cada repetição foi constituída de uma única folha por planta. Tais parâmetros foram medidos em quatro horários: 08:00,

10:30, 13:00 e 15:30 h. Para evitar-se que a ocorrência de variações climáticas ao longo do horário de avaliação afetasse a tomada dos dados, as avaliações nas várias repetições foram realizadas de forma casualizada. As taxas 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 um analisador de gases a infravermelho portátil (LCA4, Analytical Development Company, Hoddesdon, Reino Unido).

Os parâmetros de fluorescência, no campo, foram medidos nas mesmas folhas utilizadas para as medições de trocas gasosas, por meio de fluorômetro modulado, já citado. Após serem adaptados ao escuro, por 30 min, tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($1-2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de $6000 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 1 s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida (F_m). Nas amostras adaptadas ao escuro, a eficiência 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), sob irradiância natural, foi estimada e, subseqüentemente, um pulso de luz saturante ($6000 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 1 s) foi aplicado para medir-se a fluorescência máxima das amostras sob luz (F_m'). Com esses parâmetros, estimou-se o rendimento quântico do transporte de elétrons através do FSII (Φ_{FSII}), conforme descrito por Genty *et al.* (1989).

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 absorptância foliar foi calculada a partir da concentração de clorofila por unidade de área (Evans 1993). A TTE foi estimada como:

$$\text{TTE} = [\text{RFA interceptada pela folha}] \times [\text{absorptância foliar}] \times \Phi_{\text{FSII}} \times 0,5$$

Em laboratório, foram avaliadas as respostas de diversos parâmetros de fluorescência, em função do nível de irradiância, tendo como objetivo observar a capacidade de utilização fotoquímica e de dissipação não-fotoquímica da energia luminosa, sob condições controladas. 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 ($1-2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para a determinação de F_0 . Em seguida, um pulso de luz saturante, com uma irradiância de $6000 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 1 s, foi aplicado para estimar-se F_m . Subseqüentemente, as folhas foram irradiadas com luz actínica durante 300 s, às intensidades de 150, 300, 450, 600, 900 e $1500 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para a obtenção de F_s . Em seguida, outro pulso de luz saturante ($6000 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 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 da F_0 adaptada à luz (F_0'). Foram estimados, então, a fração da irradiância não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente (P_E), a fração de irradiância utilizada na fase fotoquímica do FSII (P), e a fração de irradiância dissipada termicamente (D), conforme Demming-Adams *et al.* (1996).

e - Atividades enzimáticas

Foram determinadas as atividades de várias enzimas do sistema antioxidante: dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1, Giannopolitis e Ries 1977), catalase (CAT, EC 1.11.1.6; Havir *et al.* 1987), peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11; Nakano e Asada 1981) e redutase da glutatona (GR, EC 1.6.4.2; Foyer e Haliwell 1976). Detalhes adicionais estão descritos em Pinheiro *et al.* (2004). A atividade dessas enzimas foi expressa em unidades (U) por unidade de área. As atividades enzimáticas foram similares quando expressas por unidade de massa. Cada U corresponde à oxidação de $1 \mu\text{mol}$ ascorbato min^{-1} para a APX, de $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1}$ para a CAT, e de $1 \mu\text{mol}$ de NADPH min^{-1} , para a GR. Para a SOD, cada U corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do corante azul de nitro-tetrazólio. A carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato (Rubisco, EC 4.1.1.39) foi extraída a 4°C , em tampão descrito em Geigenberger e Stitt (1993). O extrato enzimático foi dessalinizado em coluna Sephadex G-25. As atividades inicial e total foram medidas espectrofotometricamente, rastreando-se a oxidação do NADH a 340 nm (Sharkey *et al.* 1991).

f - Ascorbato e desidroascorbato

Ascorbato e desidroascorbato foram determinados pelo método de Arakawa *et al.* (1981).

g - Danos celulares

Danos celulares, que indicam a ocorrência de estresse oxidativo, foram avaliados por meio da peroxidação de lipídios, via acúmulo de aldeído malônico (MDA), conforme Cakmak e Horst (1991), e pelo extravasamento de eletrólitos, que foi avaliado se utilizando um condutivímetro (Biosystems LTDA, São José dos Pinhais, PR, Brasil) (Lima *et al.* 2002). Para tal, discos foliares foram analisados imediatamente após a coleta.

h - Pigmentos

Clorofilas e carotenóides totais foram estimados espectrofotometricamente, como descrito em Lichtenthaler (1987).

i - Nitrogênio Total

Amostras foliares foram secas a 70°C, por 72 h. O nitrogênio orgânico foi determinado conforme Jackson (1958) e o nitrogênio nítrico, segundo Cataldo *et al.* (1975). A soma das duas frações representa o nitrogênio total.

3 - RESULTADOS

a - Potencial hídrico

O potencial hídrico de antemanhã foi maior que -0,25 MPa em agosto, e próximo a 0,0 MPa em dezembro e outubro (dados não mostrados).

b - Ambiente

A RFA incidente variou, aproximadamente, de 840 a 2100 $\mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas parcelas a plena exposição solar, e de 300 a 970 $\mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas parcelas sob sombra, ao longo dos horários avaliados (Fig. 1).

Observou-se que as médias diárias de T_f , independentemente dos horários de medição, foram menores para o café sombreado (1,4 a 2,6°C em agosto, até 4°C em dezembro, e de 0,8 a 1,7°C em outubro (Fig. 1), com exceção às 08:00 h em outubro e às 13:00 h em dezembro, em que T_f foi semelhante para as plantas em ambos tratamentos. Em todas as épocas avaliadas, os valores médios de δe (Fig. 1) foram menores para o café sob sombra, com exceção às 08:00 h em agosto e às 13:00 h em dezembro, com valores similares em plantas de ambos tratamentos. Em dezembro, os valores médios de δe foram maiores em plantas de ambos tratamentos, quando comparadas às outras épocas (Fig. 1). Tais

diferenças deveram-se às maiores temperaturas do ar ao longo do dia em dezembro, quando comparadas com as das outras épocas (dados não mostrados).

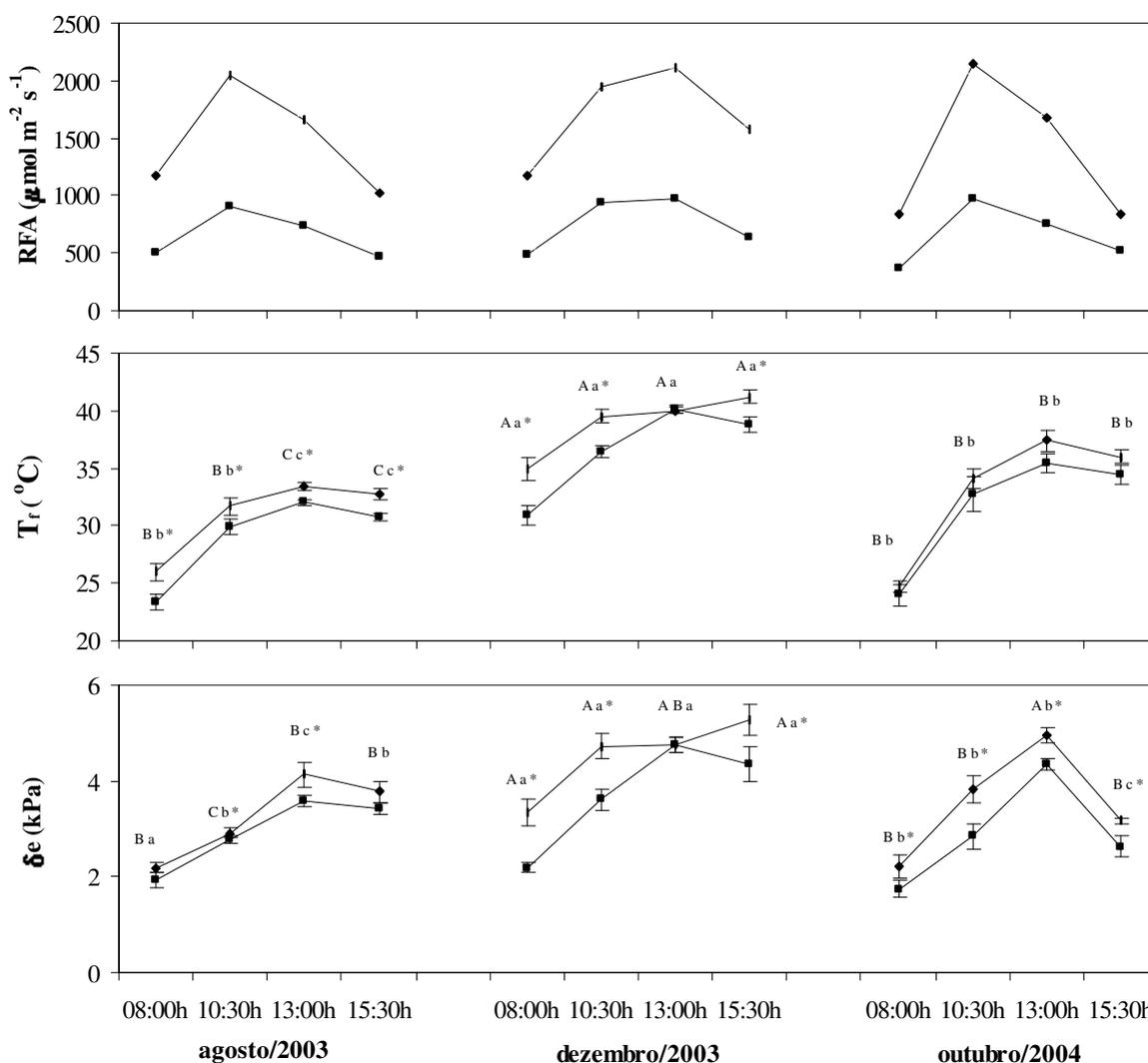


Fig.1 Curso diário da radiação fotossinteticamente ativa (RFA), da temperatura foliar (T_f) e do déficit de pressão de vapor entre a folha e a atmosfera (δe) em plantas de café a pleno sol (linha cheia) e sob sombra (linha tracejada), em três épocas de avaliação. Diferenças estatísticas entre médias obtidas nas três épocas, dentro de um mesmo horário, são indicadas por letras maiúsculas para plantas a pleno sol, e por letras minúsculas, para plantas sob sombra (Newman-Keuls, $P = 0,05$). Asterisco (*) denota diferença significativa (teste t , $P = 0,05$) entre as médias dos regimes de luz, dentro de um mesmo horário e época de avaliação. Exceto para RFA, $n = 6 \pm$ erro padrão da média (EP)

c - Trocas gasosas

Considerando-se cada época de avaliação de forma independente, observou-se que a magnitude das trocas gasosas foi similar entre as plantas dos diferentes regimes de luz, na maioria dos horários de avaliação (Fig. 2). Contudo, os maiores valores de A e g_s foram observados nos horários de 08:00 e 10:30 h em outubro para ambos regimes de luz; no entanto, sob sombra, g_s foi maior também em dezembro às 08:00 h (Fig. 2). Com relação à razão C_i/C_a , não se observou alteração entre plantas a pleno sol e sob sombra, quando comparadas dentro de uma mesma época, bem como quando comparadas nas diferentes épocas de avaliação, exceto nas plantas sob sombra, às 8:00 h, em outubro (Fig. 2). Além disso, reduções de g_s ao longo do dia não foram acompanhadas de reduções proporcionais em C_i/C_a , evidenciando, assim, que reduções em A podem ter sido resultantes, mais provavelmente, de limitações não-estomáticas ou bioquímicas à fotossíntese. Adicionalmente, não foi observada diferença na atividade inicial e total da rubisco (Fig. 3), independentemente dos tratamentos aplicados.

d - Fluorescência e fotoinibição

A eficiência fotoquímica máxima do FSII, avaliada pela razão F_v/F_m , e F_0 não diferiram, na antemã, entre as plantas dos diferentes regimes de luz nos meses de agosto e dezembro. Entretanto, em outubro, folhas do tratamento sombreado exibiram maior F_v/F_m e menor F_0 quando comparadas às do tratamento a pleno sol (Fig. 4). Registre-se, não obstante, que os valores de F_v/F_m foram superiores a 0,80 em outubro. Por outro lado, tomando-se os dados dessa época como uma referência, observaram-se menores valores de F_v/F_m e maiores valores de F_0 nas plantas em agosto, sugerindo ocorrência de fotoinibição crônica. Ainda em agosto, o efeito dos diferentes regimes de luz sobre F_v/F_m , ao longo do dia, foi evidente apenas na medição realizada às 10:30 h, em que se observou maior valor daquela razão (13%) para as plantas sombreadas (Fig. 5). Foram observadas, nos meses de dezembro e outubro, diferenças em F_v/F_m quase sempre significativas, porém de pequena magnitude, ao longo do dia, entre plantas a pleno sol e sob sombra (Fig. 5). Os maiores valores de F_0 foram observados em agosto, enquanto as menores médias foram obtidas em outubro, independentemente do horário de medição; valores intermediários foram observados em dezembro (Fig. 5). Ressalte-se que, considerando-se cada época

separadamente, verificaram-se menores valores de F_0 em outubro, cujas médias foram sempre superiores para plantas a pleno sol (Fig. 5).

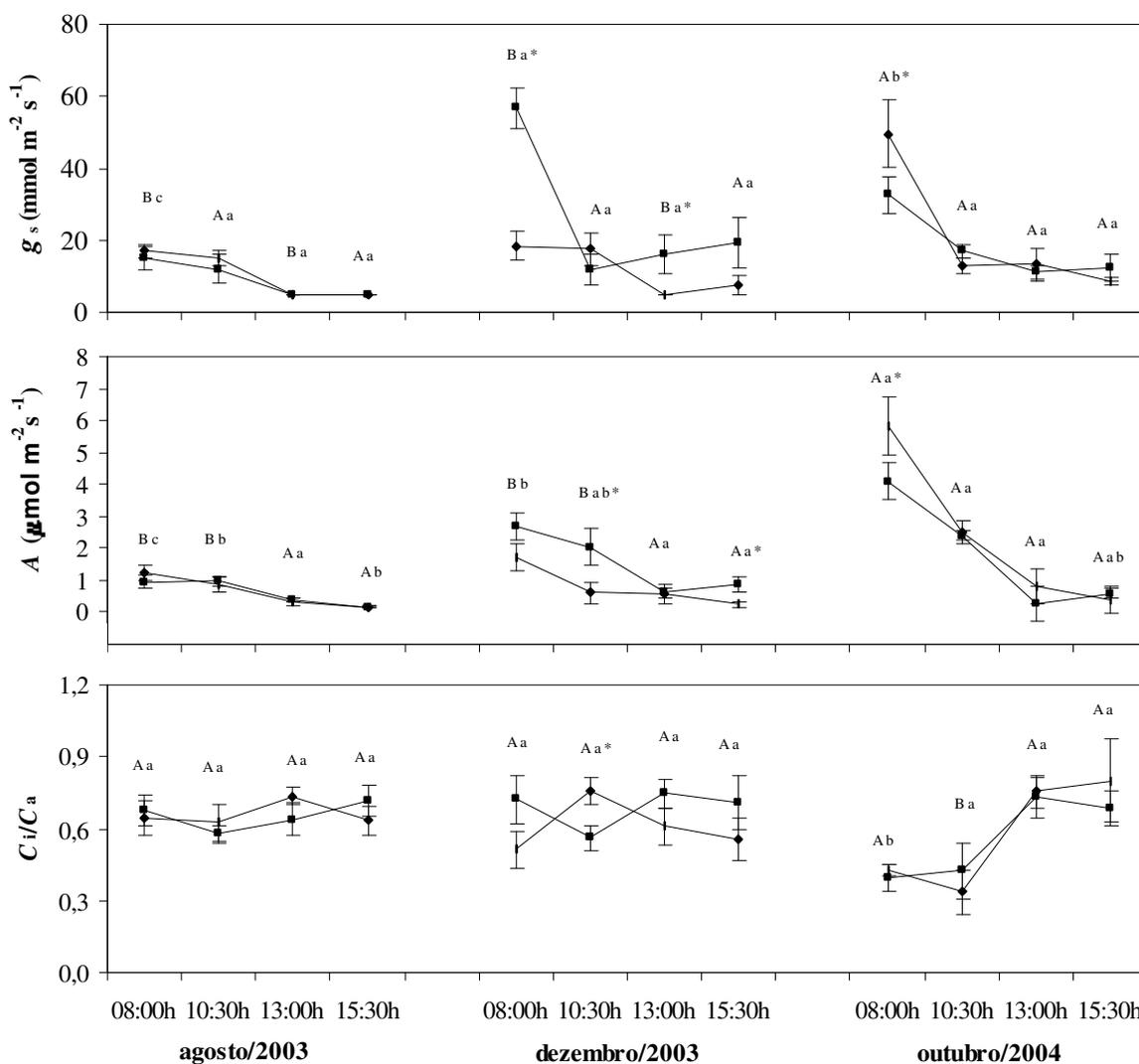


Figura 2. Curso diário da condutância estomática (g_s), da taxa de assimilação líquida de carbono (A) e da razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) em plantas de café a pleno sol (linha cheia) e sob sombra (linha tracejada), em três épocas de avaliação. Estatísticas conforme Fig. 1

e - Pigmentos e nitrogênio total

A concentração de clorofila total (Fig. 6), nas plantas sob sombra, foi maior em outubro, 57 e 28%, em relação a agosto e dezembro, respectivamente. Nas plantas a pleno sol, a concentração de clorofila total, em outubro e dezembro, foi, em média, 43% superior

que em agosto. Observaram-se maiores níveis de clorofila total nas plantas à sombra em agosto (16%) e em outubro (38%) em relação aos das plantas a pleno sol. A concentração

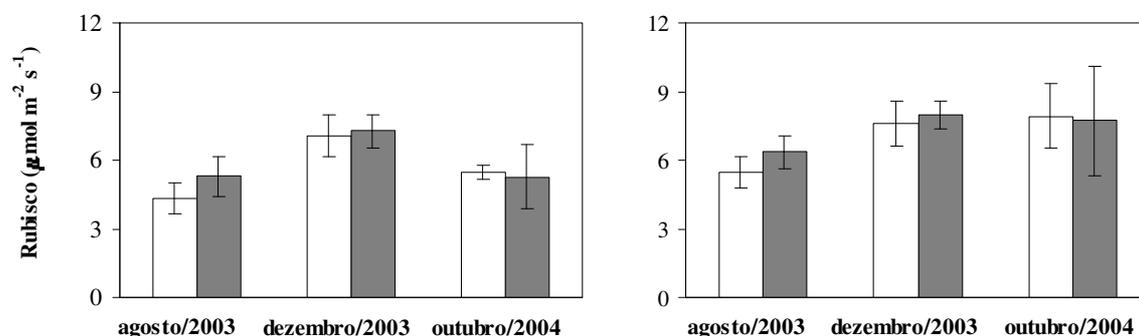


Figura 3. Atividade inicial (esquerda) e total (direita) da rubisco em plantas de café a pleno sol (colunas vazias) e sob sombra (colunas cheias), em três épocas de avaliação. Não foram observadas quaisquer diferenças estatísticas entre as médias ($n = 6 \pm$ erro padrão da média apresentadas (testes t e Newman-Keuls, $P = 0,05$)

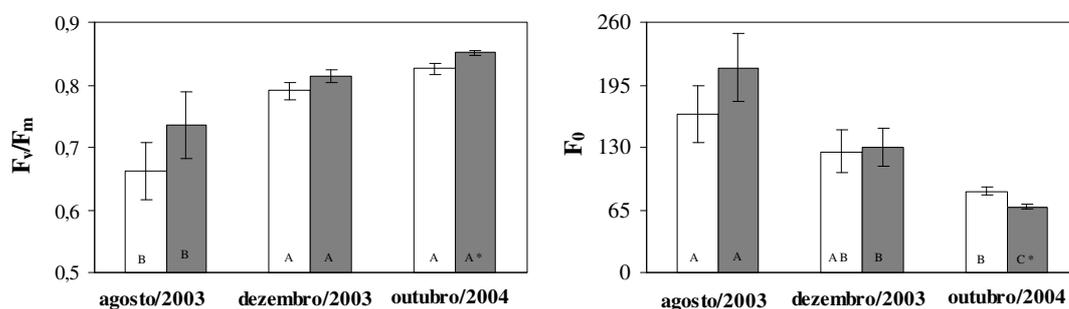


Figura 4. Eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) e fluorescência inicial (F_0), na antemãhã, em plantas de café a pleno sol (colunas vazias) e sob sombra (colunas cheias), em três épocas de avaliação. Médias obtidas ao longo das épocas de avaliação acompanhadas de diferentes letras são estatisticamente distintas entre si, dentro de um mesmo regime de luz (Newman-Keuls, $P = 0,05$). Asterisco (*) indica diferenças entre regimes de luz, dentro de mesma época (teste t , $P = 0,05$). $n = 6 \pm$ EP

de carotenóides totais (Fig. 6) foi 23% menor nas plantas a pleno sol em relação à das plantas sob sombra em outubro, mas não se observou diferença significativa nas outras épocas. Com relação às épocas de avaliação, verificaram-se menores concentrações de

carotenóides tanto para plantas sob sombra como para as a pleno sol em agosto, que foram cerca de 60% menores do que em dezembro e outubro. Não se observaram diferenças na

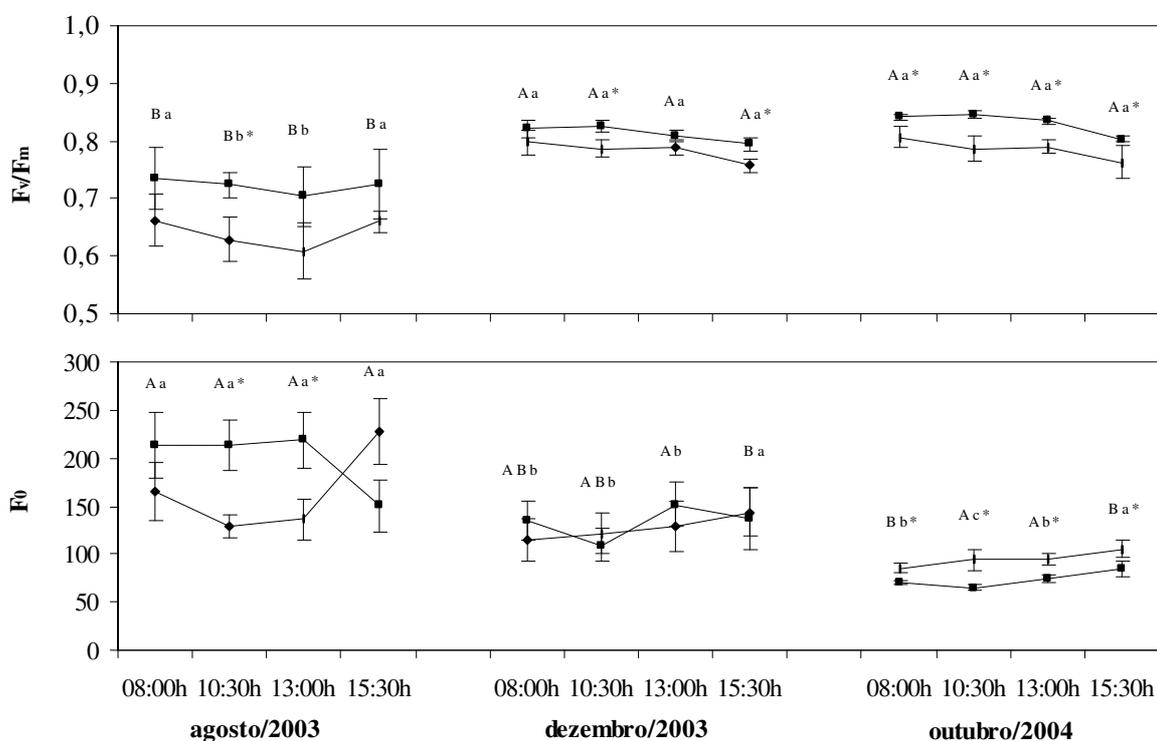


Figura 5. Curso diário da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) e da fluorescência inicial (F_0) em plantas de café a pleno sol (linha cheia) e sob sombra (linha tracejada), em três épocas de avaliação. Estatísticas conforme Fig 1

razão clorofila *a*/clorofila *b* (Fig. 6) entre plantas cultivadas à sombra ou a pleno sol. Contudo, tal razão aumentou em cerca de 50%, em dezembro e outubro, em comparação a agosto, independentemente dos regimes de irradiância. A razão clorofila total/carotenóides totais (Fig. 6), em dezembro e outubro, foi menor tanto para plantas a pleno sol (~24%) como para plantas sob sombra (~28%), em relação a agosto. Entretanto, apenas em outubro aquela razão foi superior (20%) para plantas sob sombra quando comparadas com plantas a pleno sol. Por outro lado, a concentração foliar de nitrogênio total não foi afetada pelos tratamentos aplicados, independentemente das épocas de avaliação. Ademais, a concentração de nitrogênio foi sempre superior a 2,7% (dados não mostrados), valor indicativo de que as plantas não sofreram deficiência de nitrogênio (Malavolta *et al.* 1993). Assim, as menores concentrações de clorofilas e de carotenóides observadas em agosto não devem ter sido associadas a diferenças na disponibilidade de nitrogênio. De fato, não se

observou qualquer correlação entre clorofila total e conteúdo de nitrogênio total ($r^2 = 0,098$, $P = 0,05$), quando ambos foram expressos em mg g^{-1} MS.

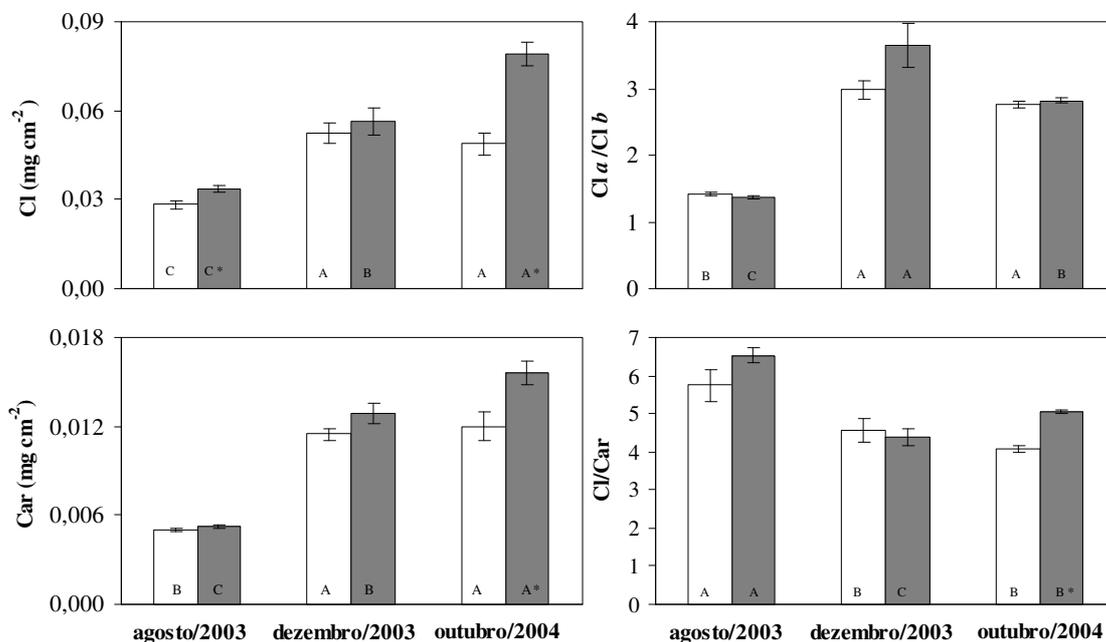


Figura 6. Concentração de clorofila total (Cl), carotenóides totais (Car), razão clorofila *a*/clorofila *b* (Cl *a*/Cl *b*) e razão clorofila total/carotenóides totais (Cl/Car), em plantas de café a pleno sol (colunas vazias) e sob sombra (colunas cheias), em três épocas de avaliação. Estatísticas conforme Fig. 4

f - Ângulo foliar, rendimento quântico de transporte de elétrons e taxa de transporte de elétrons

Em dezembro, os ângulos foliares, independentemente do regime de luz, foram menores quando comparados com os valores obtidos em agosto e outubro. O ângulo foliar das plantas a pleno sol foi sempre maior que o das plantas sob sombra, apesar de, em outubro, tais diferenças não terem sido significativas (Fig. 7). Em dezembro, o ângulo foliar, ao longo do dia (Fig. 7), variou, de 31 a 42° para plantas a pleno sol, e de 21 a 34° para plantas sob sombra. Em agosto e outubro, não se observaram variações diurnas no ângulo foliar, registrando-se valores médios de 63° e 44° (agosto) e 54 a 45° (outubro), respectivamente para folhas de plantas a pleno sol e sob sombra (Fig. 7). O rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}) (Fig. 7) foi quase sempre menor para plantas a

pleno sol em relação às sob sombra em agosto (cerca de 52%), em dezembro (48% às 8:00 h, 38% às 10:30 h e 32% às 13:00 h, mas com valores similares entre plantas sob sombra e a pleno sol às 15:30 h) e em outubro (41% às 08:00 h, 31% às 10:30 h, com exceção das 13:00 e 15:30 h, quando os valores foram semelhantes entre as plantas para ambos regimes de luz). Em agosto, Φ_{FSII} manteve-se praticamente constante ao longo do dia, para plantas a pleno sol e sob sombra. Entretanto, em dezembro e outubro, as plantas sob sombra apresentaram uma queda em Φ_{FSII} ao longo do dia. Já nas plantas a pleno sol, Φ_{FSII} pouco ou nada variou ao longo do dia, em dezembro e outubro (Fig. 7). Entretanto, em outubro, às 15:30 h, tanto nas plantas sob sombra quanto nas a pleno sol, Φ_{FSII} aumentou em relação às 13:00 h. As variações diurnas na taxa de transporte de elétrons (TTE) (Fig. 7) acompanharam, em larga extensão, as variações diurnas da irradiância interceptada pela folha, nas três épocas avaliadas (dados não-mostrados). Assim, observou-se que, nas medições de agosto e dezembro, os valores de TTE, tanto para plantas a pleno sol quanto para plantas sombreadas, foram menores às 08:00 h, tendo seu máximo às 10:30 h, seguindo-se de progressiva redução durante à tarde (Fig. 7). Em outubro, um padrão de comportamento semelhante foi observado, diferindo das demais épocas apenas na medição das 15:30 h, cujos valores de TTE não mais se reduziram em relação aos observados às 13:00 h (Fig. 5), para plantas de ambos regimes de luz. Considerando-se uma mesma época, observou-se que TTE para plantas a pleno sol foi significativamente superior ao das plantas sob sombra apenas às 08:00 h em agosto (28%), às 10:30 h em dezembro (20%), e às 10:30 h (49%) e 13:00 h (70%) em outubro (Fig. 7). Quando se comparam plantas a pleno sol nas diferentes épocas de avaliação, o valor maior de TTE às 10:30 h ocorreu em dezembro e outubro em relação a agosto. Para plantas sob sombra, também nos mesmos horários, os maiores valores de TTE foram obtidos em dezembro, seguidos dos de agosto e outubro.

g - Utilização fotoquímica e dissipação não-fotoquímica da irradiância actínica

Considerando-se a fração de energia absorvida utilizada na fase fotoquímica da fotossíntese (P), a fração dissipada na forma de calor (D) e a fração da energia não utilizada na fase fotoquímica e nem dissipada como calor (P_E), observou-se que, de modo geral, o incremento na radiação resultou em incrementos em D e P_E paralelamente a reduções em P , sendo tal resposta similar entre plantas a pleno sol e plantas sob sombra (Fig. 8). Nos meses de dezembro e outubro, D foi superior nas plantas a pleno sol quando

submetidas à RFA de $300 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo que a diferença mais expressiva entre os regimes de luz foi observada na faixa de $150\text{-}600 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apenas em agosto (Fig. 8). Nessa mesma faixa de RFA e época de medição, observou-se redução progressiva em P para ambos regimes de luz, sendo os valores de P nas plantas sob sombra significativamente superiores àqueles observados para plantas a pleno sol (Fig. 8). Valor superior de P foi também observado nas plantas sob sombra em outubro, a $300 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 8). Folhas de plantas sob sombra exibiram maiores valores de P_E que folhas de plantas a pleno sol em dezembro, ao aplicar-se RFA superior a $900 \mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 8). Tendência similar foi observada em agosto.

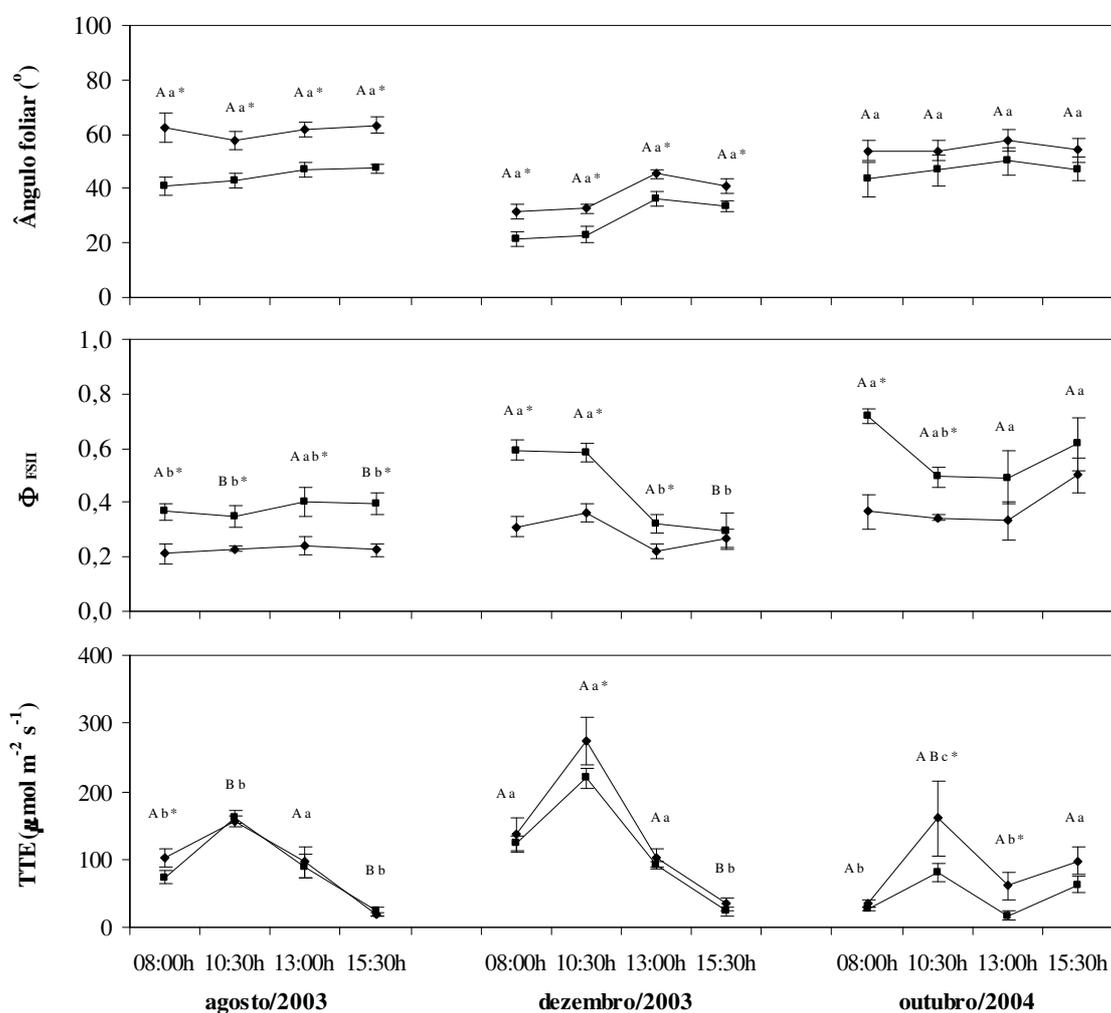


Figura 7. Curso diário do ângulo foliar, do rendimento quântico de transporte de elétrons (Φ_{FSII}) e da taxa de transporte de elétrons (TTE), em plantas de café a pleno sol (linha

cheia) e sob sombra (linha tracejada), em três épocas de avaliação. Estatística conforme Fig. 1

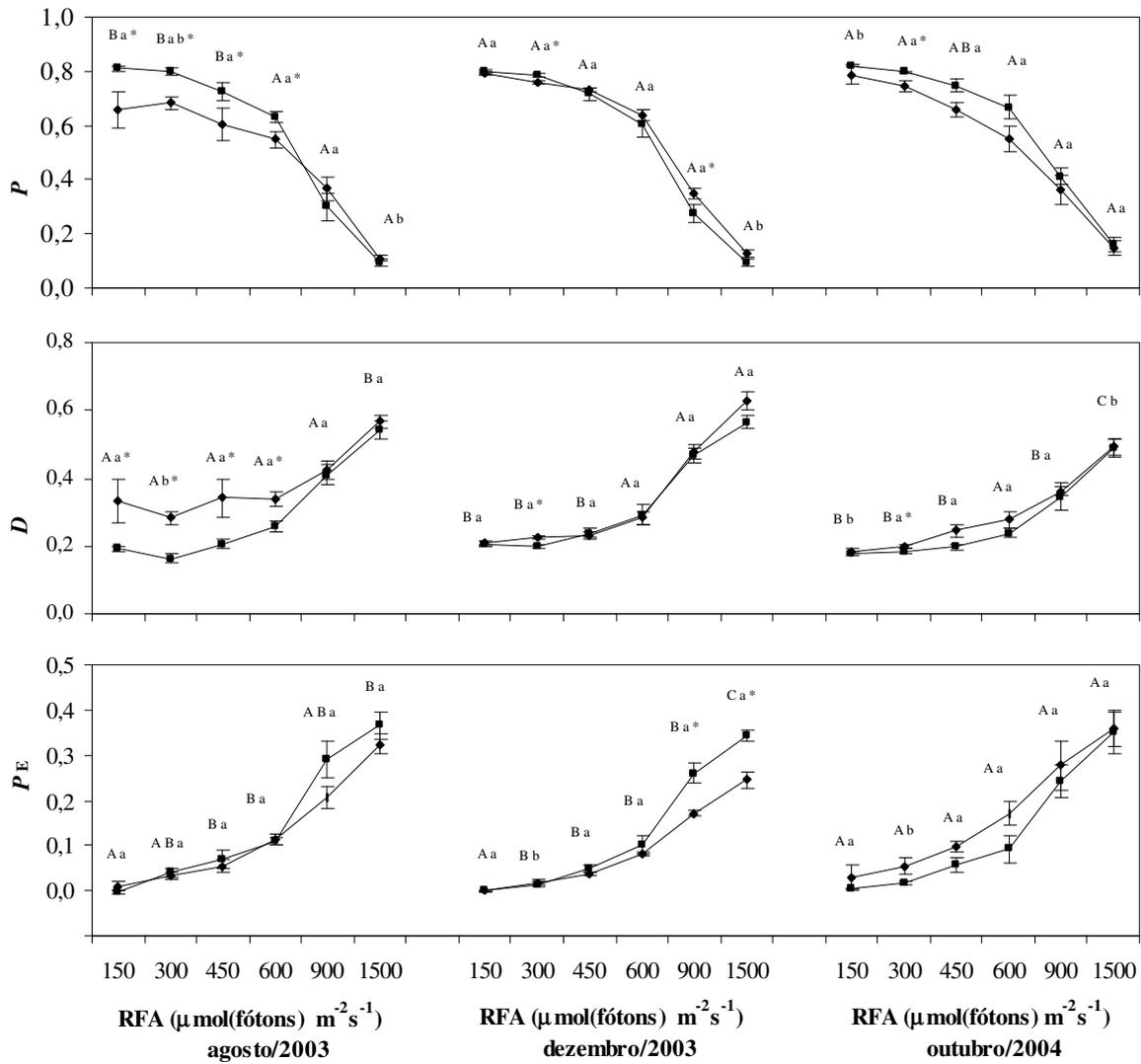


Figura 8. Variação na energia utilizada na fase fotoquímica da fotossíntese (P), na energia dissipada na forma de calor (D) e na energia não utilizada na fase fotoquímica e nem dissipada como calor (P_E) em plantas de café a pleno sol (linha cheia) e sob sombra (linha tracejada), em três épocas de avaliação, em função da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) aplicada. Estatística conforme Fig. 1

h - Sistema antioxidativo

As atividades das enzimas do sistema antioxidativo são mostradas na Fig. 9. Pode-se observar que a atividade da SOD foi maior tanto em plantas a pleno sol quanto sob sombra em outubro do que em agosto (70% para pleno sol e 52% sob sombra) ou dezembro (76% para pleno sol e 66% para sombra). Entretanto, não houve diferença na atividade da SOD

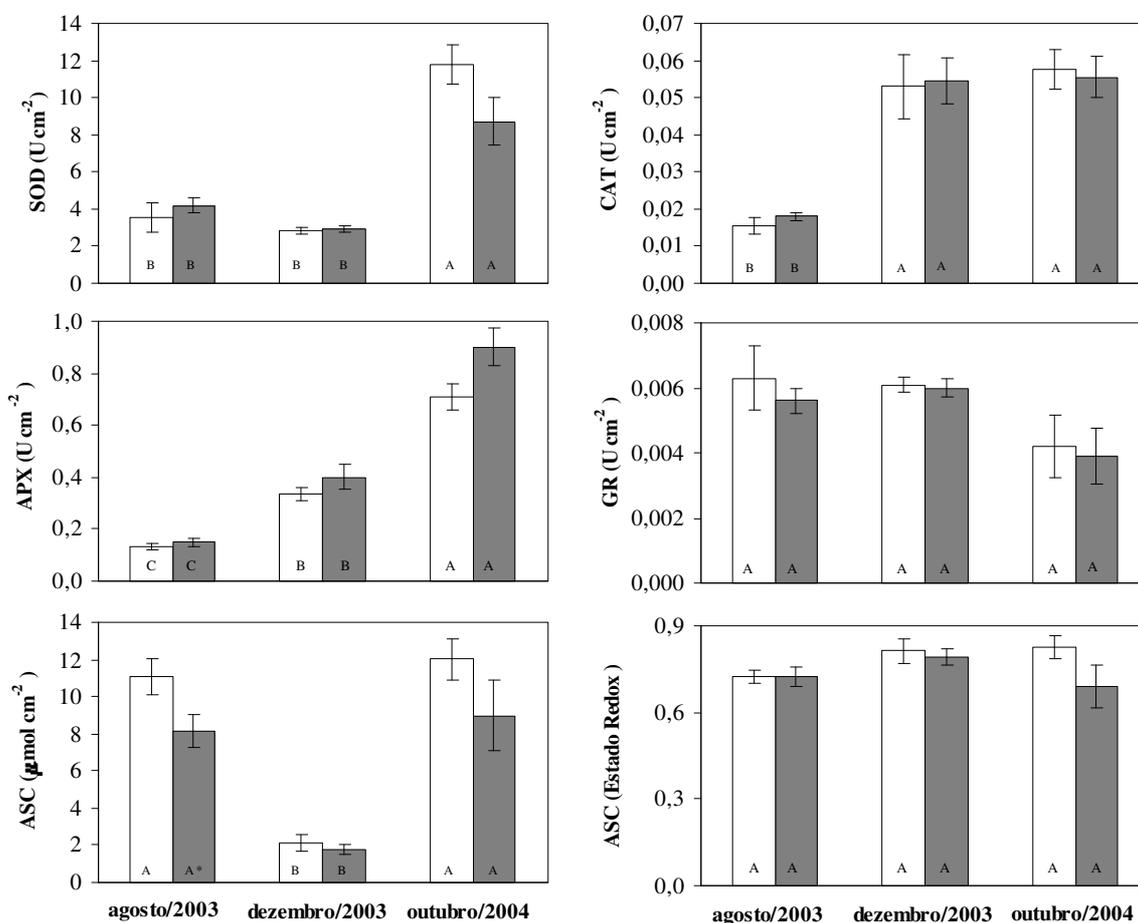


Figura 9. Atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutaciona (GR), e concentração de ascorbato (ASC) e estado redox do ascorbato em plantas de café a pleno sol (colunas vazias) e sob sombra (colunas cheias), em três épocas de avaliação. Estatísticas conforme Fig. 4

entre plantas a pleno sol e sob sombra nas épocas avaliadas. A atividade da CAT foi maior em plantas de ambos regimes de luz em dezembro e outubro (~70%), comparando-se a agosto. Contudo, não houve diferença na atividade da CAT entre as plantas de ambos regimes de luz dentro das épocas avaliadas. Em comparação a outubro, a atividade da APX foi menor para plantas de ambos tratamentos em agosto (~ 82%) e dezembro (~55%), mas não foi observada diferença entre as plantas de ambos tratamentos dentro das épocas. Para

GR, não foi verificada qualquer diferença na atividade entre as plantas a pleno sol ou sob sombra nas épocas de avaliação, bem como entre as épocas de avaliação.

Independentemente dos regimes de luz, a concentração de ascorbato foi maior (~60%) em agosto e em outubro em relação a dezembro. Nas plantas a pleno sol, observaram-se incrementos, em relação às plantas sob sombra, na concentração de ascorbato, em agosto e outubro, mas apenas no primeiro tais diferenças foram significativas (Fig. 9). Contudo, não se observou diferença no estado redox do ascorbato entre as épocas bem como entre os tratamentos dentro das épocas (Fig. 9).

i - Danos celulares

Em dezembro, a concentração de aldeído malônico (MDA) (Fig. 10) foi menor nas plantas sob sombra (20%) e a pleno sol (14%) quando comparada com os dados obtidos em agosto e outubro, cujos valores foram similares, independentemente do regime de luz. As plantas a pleno sol, em agosto, apresentaram maior extravasamento de eletrólitos (25%) (Fig. 10) em relação a dezembro, mas sem diferença em comparação a outubro. Nas plantas sob sombra, observou-se maior extravasamento em agosto e outubro, que foi, em média, 17% maior do que em dezembro. Contudo, a concentração de MDA e o extravasamento de eletrólitos (Fig. 10) não foram influenciados pelos regimes de luz aplicados.

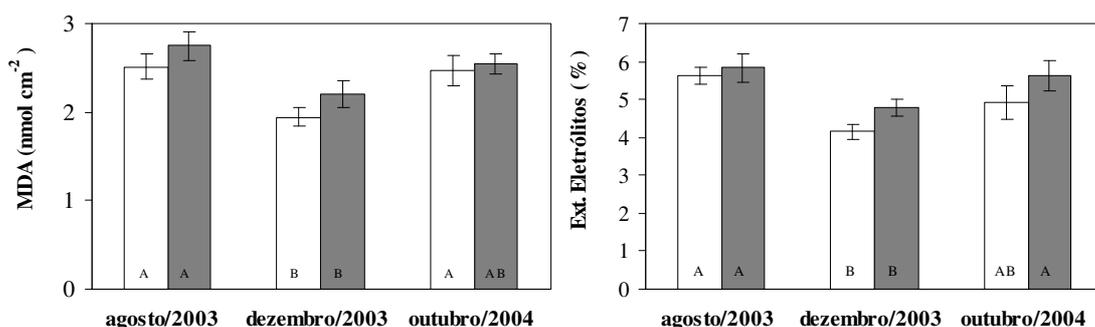


Figura 10. Concentração de aldeído malônico (MDA) e extravasamento de eletrólitos em plantas de café a pleno sol (colunas vazias) e sob sombra (colunas cheias), em três épocas de avaliação. Estatísticas conforme Fig. 4

4 - DISCUSSÃO

O cafeeiro tem sido caracterizado por apresentar baixas taxas de assimilação líquida do carbono (A), mesmo sob condições ótimas de cultivo (Silva *et al.* 2004), e os resultados aqui apresentados corroboram esse registro. Os mecanismos que explicariam os baixos valores de A , em café, não são bem conhecidos, mas uma alta resistência mesofílica à difusão do CO_2 , desde as cavidades subestomáticas até os sítios de carboxilação, parece ter um papel preponderante nessa resposta (DaMatta *et al.* 2001, Silva *et al.* 2004). Em todo o caso, conforme sumariam DaMatta (2004a,b), muitos trabalhos indicam que a fotossíntese pode ocorrer a maiores taxas quando o café é cultivado sob sombra; todavia, conforme assinala o mesmo autor, na maioria dos trabalhos mostrando maior A à sombra que a pleno sol, menor g_s de folhas expostas parece largamente explicar esse padrão. Neste trabalho, não se pôde, contudo, observar diferenças concretas de taxas de fotossíntese entre plantas cultivadas à sombra ou à plena exposição solar. De modo geral, as taxas de fotossíntese foram muito baixas, fato não necessariamente associado à baixa g_s , conforme discutido à frente.

Em agosto, época relativamente seca e fria, apesar de T_f e δ_e situarem-se numa faixa presumivelmente mais adequada para o funcionamento normal do aparelho fotossintético, as taxas de fotossíntese foram extremamente baixas ao longo do dia, mesmo não se observando déficits hídricos internos severos, a julgar-se pelos valores relativamente elevados de Ψ_{am} . Mesmo em dezembro ou outubro, quando se esperariam taxas maiores de crescimento e de fotossíntese, os valores de A foram, de modo geral, baixos e 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 mostrado por Silva *et al.* (2004). Estas informações pressupõem a ocorrência de limitações à fotossíntese, que podem ser de natureza estomática e/ou não-estomática. No entanto, neste trabalho, em muitas situações, as variações em g_s não foram acompanhadas efetivamente por alterações proporcionais na razão C_i/C_a , indicativo de que limitações não-estomáticas tenham sido preponderantes na redução de A (DaMatta 2003). Por exemplo, em outubro, no período da tarde, observaram-se mesmo incrementos naquela razão, ainda que A e g_s se reduzissem marcadamente. Ademais, incrementos potenciais na respiração mitocondrial e na fotorrespiração, na medida em que T_f aumenta, elevaria a razão C_i/C_a , acarretando, portanto, decréscimos em g_s e na carboxilação (Jifon e Syvertsen 2003). De fato, independentemente dos tratamentos aplicados e épocas de avaliação, as atividades inicial e total da rubisco (esta, ensaiada sob condições ótimas) foram muito baixas, evidenciando limitações da capacidade

carboxilativa. Contudo, limitações *in vivo* à capacidade de carboxilação não devem estar associadas a reduções em TTE, visto que A foi reduzida em maior extensão que aquele parâmetro, donde pode-se inferir que potenciais fotodanos ou fotoinibição ao FSII não explicariam as limitações observadas na fotossíntese líquida. Adicionalmente, em agosto, a ocorrência de temperaturas noturnas relativamente baixas associadas a taxas de crescimento negligenciáveis devem ter contribuído para ocorrência de limitações bioquímicas e biofísicas à fotossíntese, conforme proposto por Bauer *et al.* (1985) e Silva *et al.* (2004).

Cumpramos ressaltar que, apesar de a estimativa de C_i ser sujeita a uma série de erros potenciais, especialmente quando g_s é baixa, parece razoável admitir-se que, devido à natureza homobárica das folhas do café, não se tenha sobrestimado a razão C_i/C_a (DaMatta 2003), sugerindo que, de fato, limitações não-estomáticas foram, na maioria das vezes, de fundamental importância na limitação da fotossíntese.

Os valores de irradiância de saturação, para folhas isoladas do café, são normalmente baixos, entre 300-600 $\mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com plantas cultivadas à sombra, ou folhas mais internas da copa, mostrando os menores valores (Kumar e Tieszen 1980). Neste trabalho, as folhas amostradas das plantas à sombra interceptaram, em pelo menos um horário, RFA superiores a 600 $\mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à exceção de outubro. Concomitantemente, estes resultados podem explicar o comportamento similar de folhas de plantas à sombra e a pleno sol, na medida em que se incrementou a irradiância actínica. Observaram-se decréscimos mais expressivos em P em paralelo a aumentos igualmente expressivos em D e P_E a irradiâncias superiores a 600 $\mu\text{mol}(\text{fótons}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. De qualquer modo, estes dados sugerem, 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 formação de danos fotooxidativos. Resta investigar a tendência de menores valores de P_E sob irradiâncias potencialmente fotoinibitórias, conforme observadas nas folhas de plantas a pleno sol em dezembro e em agosto.

Em dezembro e em outubro, os valores de F_v/F_m na antemã estiveram dentro de uma faixa ótima (0,80-0,83) relatada por Björkman e Demmig (1987). Ao longo do dia, nessas épocas, não foram observados valores de F_v/F_m inferiores a 0,75, mesmo nas plantas a pleno sol. Por conseguinte, potenciais decréscimos na razão F_v/F_m devem ser atribuídos a mecanismos de fotoproteção, i.e., fotoinibição dinâmica (Demmig-Adams e Adams 1992,

Lambers *et al.* 1998). Por outro lado, em agosto, foram observados, sistematicamente, menores valores de F_v/F_m associados com maiores valores de F_0 , mesmo na antemã, independentemente dos tratamentos aplicados. Estes resultados indicam ocorrência de uma discreta fotoinibição crônica, na medida em que não se observou recuperação da eficiência fotoquímica do FSII após o período noturno. Resultados semelhantes foram relatados por DaMatta *et al.* (1997) para plantas de café jovens cultivadas em vasos. Reduções persistentes na eficiência do FSII têm sido atribuídas à retenção de componentes desepoxidados do ciclo das xantofilas (zeaxantina e anteraxantina), os quais poderiam participar ativamente na dissipação de energia de excitação e, desse modo, proteger o FSII de sobre-excitação e fotodanos (Gilmore 1997). Segundo García-Plazaola *et al.* (1999), essa resposta 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. Conforme Demmig-Adams e Adams (1992), retenção noturna de altos níveis de zeaxantina pode ocorrer mesmo em plantas aclimatadas a temperaturas noturnas relativamente baixas (0-12°C). 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). 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). Nas condições de agosto, as taxas fotossintéticas extremamente baixas, quer em plantas ao sol ou à sombra, favorecem a hipótese de que a fotoinibição esteve mais associada com fotodano do que com fotoproteção ao aparelho fotossintético. Registre-se, contudo, que, apesar de se observarem danos celulares, caracterizados por aumentos discretos no extravasamento de eletrólitos e peroxidação de lipídeos, eles foram de pequena magnitude, quando se compararam os valores daqueles parâmetros com os obtidos em dezembro.

As plantas podem apresentar diversos meios para se defender contra irradiâncias potencialmente fotoinibitórias. A redução da absorção da energia radiante, via decréscimos na concentração de clorofilas, aumentos do ângulo de inclinação foliar e maior reflectância da folha, podem ter impactos profundos na fotoproteção das plantas (Björkman e Demmig-Adams 1995). Neste trabalho, observaram-se maiores ângulos de inclinação das folhas de plantas a pleno sol que daquelas de plantas à sombra. Isso deve acarretar, proporcionalmente, menor interceptação do fluxo de energia radiante por unidade de área foliar incidente nas plantas a pleno sol, especialmente nas horas em que a elevação solar é

maior, concorrendo, adicionalmente, para reduzir o sobreaquecimento da folha (Falster e Westoby 2003). De qualquer modo, apenas em dezembro foram observadas variações na inclinação foliar ao longo do dia, independentemente da irradiância de crescimento. Em eucalipto, por exemplo, o ângulo azimutal e de inclinação da folha são determinados pela disponibilidade e direcionalidade da luz durante o crescimento (James e Bell 2000). Os presentes resultados não permitem inferir se resposta semelhante ocorre com o cafeeiro, mas é possível que a maturação e esclerificação da folha evitem alterações expressivas adicionais na orientação foliar. Isso explicaria o porquê de as folhas amostradas em outubro (provavelmente expandidas em período mais seco e frio), quando as taxas de fotossíntese foram relativamente mais elevadas, tivessem ângulos de inclinação substancialmente maiores que as folhas amostradas em dezembro. A incapacidade de alteração do ângulo foliar ao longo do dia poderia ser uma desvantagem para as plantas, uma vez que menor seria a capacidade de interceptação de luz quando esta está em menor intensidade (Falster e Westoby 2003). De qualquer modo, além da menor interceptação da irradiância, a menor concentração de clorofilas deve ter concorrido para reduzir a absorptância foliar e, pois, reduzir a quantidade total de energia efetivamente absorvida pelos fotossistemas, particularmente nas plantas sob plena exposição solar.

Nas plantas a pleno sol, a maior redução proporcional da absorção da energia radiante foi acompanhada, geralmente, por menor Φ_{FSII} . Decréscimos em Φ_{FSII} estão quase sempre associados a aumento da dissipação não-fotoquímica da energia absorvida (Demmig-Adams *et al.* 1996), e os resultados obtidos a partir das curvas de resposta à irradiância parecem confirmar isso. Concomitantemente, tais condições acarretaram fortes reduções em TTE das plantas expostas a pleno sol, de maneira tal que, geralmente, houve diferenças relativamente pequenas na capacidade de transporte de elétrons entre tais plantas e aquelas à sombra. Conseqüentemente, a magnitude da geração de poder redutor e ATP não deve ter sido muito diferente entre as plantas dos dois regimes de luz. Desde que as taxas de assimilação do carbono, processo considerado como o principal dreno de energia nos cloroplastos, pouco diferiu entre folhas de plantas a pleno sol e plantas sob sombra, espera-se, por conseguinte, que o nível de energia de excitação nos fotossistemas deva também ter sido semelhante entre essas plantas, na maioria das amostragens.

Em virtude do desequilíbrio entre absorção e utilização da energia radiante (A foi reduzida em extensão maior que TTE), presume-se que tenha ocorrido um excesso de poder redutor. A fim de evitar-se a formação de ERO's, que levaria à ocorrência de estresse oxidativo no FSI e, em última instância, dano ao aparelho fotossintético, aquele

excesso deve ser dissipado, e.g., via reação de Mehler, fotorrespiração, ou via outros processos em que o NADPH é consumido (Asada 1999, Ort e Baker 2002). Não obstante, em agosto, observou-se, de modo geral, menor atividade das enzimas antioxidantes, apesar da ocorrência de fotoinibição crônica associada a muitas horas de insolação naquela época. Possivelmente, a redução aparente da atividade do FSII e fotoinativação seja aumentada sob temperaturas noturnas mais baixas, na medida em que a síntese protéica é reduzida. De qualquer modo, mais estudos são necessários a fim de prover-se um quadro mais claro sobre o padrão de comportamento das enzimas antioxidantes na época mais fria. Por outro lado, nas outras épocas avaliadas, a alta atividade da CAT pode estar relacionada à maior produção de H_2O_2 nos peroxissomos, devido a um provável aumento na taxa de fotorrespiração (Ort e Baker 2002). Não está claro, todavia, porque as atividades da SOD e da APX, assim como os níveis de ascorbato, foram substancialmente menores em dezembro em relação a outubro. Uma possível explicação poderia envolver um menor número de horas de insolação em dezembro que em outubro e, portanto, menor pressão de excitação naquela época. Nesse caso, um sistema antioxidante mais robusto seria de especial interesse, permitindo uma dissipação mais eficaz da radiação excessiva.

O ascorbato é requerido tanto para eliminar diferentes ERO's, como o oxigênio singlete, radicais superóxido e hidroxil, como também atuar como agente redutor no processo de desepoxidação da violaxantina a anteraxantina e zeaxantina (Asada 1999). A tendência de maiores níveis de ascorbato reduzido, conforme observado nas plantas a pleno sol em agosto e outubro, pode, portanto, ter contribuído para aumentar a capacidade antioxidante dessas plantas em relação à das plantas sob sombra. De acordo com Wise e Naylor (1987), a manutenção do estoque de ascorbato auxiliaria grandemente as plantas a protegerem-se contra estresse oxidativo, e pode ser considerada como um indicador fisiológico de um sistema de defesa eficiente contra danos oxidativos. Os níveis de outros antioxidantes importantes, como o α -tocoferol (não mensurado neste trabalho), são usualmente maiores em plantas a pleno sol que sob sombra (García-Plazaola 1999). Conjuntamente, esses compostos poderiam auxiliar um possível aumento da capacidade de dissipação de excessos potenciais de energia de excitação nas plantas sob completa exposição solar. Tal condição explicaria, em parte, porque essas plantas puderam evitar, em comparação com plantas à sombra, a ocorrência de danos oxidativos, particularmente nas situações em que sua capacidade de transporte de elétrons foi mantida em níveis superiores aos das plantas sob sombra.

De modo geral, as plantas aclimataram-se à plena exposição solar via decréscimos na concentração de clorofilas totais, apesar de não haver diferenças na razão clorofila *a*/clorofila *b* entre plantas ao sol e plantas à sombra. Isso sugere que elas investem a mesma quantidade de N nos complexos coletores de luz (Lambers *et al.* 1998), a despeito das diferenças na intensidade da radiação interceptada. Ademais, houve pequena ou nenhuma alteração na razão clorofilas/carotenóides entre plantas ao sol e sob sombra, quando o padrão esperado de resposta seria um decréscimo relativo nessa razão nas plantas a plena exposição solar, de modo a permitir-lhes um aumento na capacidade de dissipação da energia de excitação, principalmente via operação do ciclo das xantofilas (Demmig-Adams e Adams 1992, Lambers *et al.* 1998). De qualquer modo, a redução marcante na concentração de clorofilas observada em agosto, devido, principalmente, a uma perda de clorofila *a* (não mostrado), levou a uma forte queda na razão clorofila *a*/clorofila *b*, o que poderia indicar presença de menos sítios de ligação para xantofilas (Martínez-Ferri *et al.* 2004). A redução na concentração de clorofilas e em particular de carotenóides, em agosto, suporta a hipótese de que, durante o estresse fotooxidativo, antioxidantes hidrofílicos e xantofilas seriam moléculas-alvo primárias (Wise e Naylor 1987). Ressalte-se que alguns autores têm sugerido que reduções na concentração de clorofilas podem estar associadas a processos fotooxidativos (e.g., Krause 1988), enquanto outros relacionam tais reduções com alterações na organização dos fotossistemas, de modo a servir como um mecanismo fotoprotetor (e.g., Elvira *et al.* 1998, Ottander *et al.* 1995). Neste trabalho, a redução dos níveis de clorofila associada com a manutenção do estoque de ascorbato poderiam, portanto, fazer parte de um mecanismo para prevenir uma fotodestruição severa do cloroplasto induzida pelas temperaturas noturnas relativamente baixas.

5 - Conclusões

Em síntese, os resultados sugerem que o cafeeiro, além de poder alterar a absorção da energia radiante, pode também dissipar satisfatoriamente, por vias térmicas ou não-fotoquímicas, o excesso da energia absorvida, ainda que as taxas de fotossíntese sejam consideravelmente baixas. As diferenças relativamente pequenas na magnitude das trocas gasosas, da concentração de pigmentos fotossintéticos, da fotoinibição e da capacidade antioxidante, aliadas à ocorrência de danos celulares discretos e em extensão muito similar entre folhas de plantas a pleno sol e sob sombra, sugere que o cafeeiro pode responder plasticamente às variações da irradiância. Estes resultados corroboram a asserção de DaMatta (2004a,b) e DaMatta e Rena (2002) de que o cafeeiro é uma planta facultativa de

sombra, ou, alternativamente, uma espécie com plasticidade relativamente elevada de seu aparelho fotossintético às variações da irradiância. Por fim, os resultados aqui apresentados indicam que o sombreamento resultaria em pouca fotoproteção adicional às folhas mais expostas, tampouco contribuiria decisivamente para maximizar as trocas gasosas dessas folhas, mas poderia limitar grandemente a fotossíntese da folhagem mais interna, em função da menor disponibilidade de luz. Isso parece explicar, em boa extensão, o porquê de o sombreamento resultar em reduções na produtividade de cafezais, pelo menos em regiões com características climáticas próximas às ótimas para a cafeicultura (DaMatta 2004a), como parecem ser as da região de Viçosa.

6 - Referências

- Andersson B., Ponticos M., Barber J., Koivuniemi A., Aro E.M., Hagman A., Salter A.H., Dan-Hui Y., Lindhal M. 1994. Light-induced proteolysis of photosystem II reaction centre and light-harvesting complex II proteins in isolated preparations. In: Baker N.R., Bowyer J.R. (Eds.), **Photoinhibition of Photosynthesis: from molecular mechanisms to the field**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 143-159.
- Arakawa N., Tsutsumi K., Sanceda N.G., Kurata T., Inagaki C. 1981. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agric. Biol. Chem.**, 45, 1289-1290.
- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 50, 601-639.
- Baggio A.J., Caramori P.H., Androcioli Filho A., Montoya L. 1997. Productivity of southern Brazilian coffee plantations shaded by different stockings of *Grevillea robusta*. **Agrofor. Syst.**, 37, 111-120.
- Bauer H., Wierer R., Hatheway H., Larcher W. 1985. Photosynthesis of *Coffea arabica* after chilling. **Physiol. Plant.**, 64, 449-454.
- Beer J., Muschler R., Kass D., Somarriba E. 1998. Shade management in coffee and cacao plantations. **Agrofor. Syst.**, 38, 139-164.
- Björkman O., Deming 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., Deming-Adams B. 1995. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: Schulze E.-D., Caldwell M.M. (Eds.), **Ecophysiology of Photosynthesis**. Berlin: Springer-Verlag, 17-47.

- Butler D.R. 1979. Coffee leaf temperatures in a tropical environment. **Acta Bot. Neerl.**, 26, 129-140.
- 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.
- Cannell M.G.R. 1975. Crop physiological aspects of coffee bean yield: a review. **J. Coffee Res.**, 5, 7-20.
- Cannell M.G.R. 1985. Physiology of coffee crop. In: Clifford M.N., Willson K.C. (Eds.), **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Helm, 108-134.
- Caramori P.H., Androcioli Filho A., Bagio A. 1995. Arborização do cafezal com *Grevillea robusta* no norte do estado do Paraná. **Arq. Biol. Tecnol.**, 38, 1031-1037.
- Castillo Z.J., López A.R. 1966. Nota sobre el efecto de la intensidad de la luz en la floración del café. **Cenicafé**, 17, 51-60.
- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., Youngs V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.**, 6, 71-80.
- DaMatta F.M. 2003. Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan E. (Ed.), **Advances in Plant Physiology**, v.5, Jodhpur: Scientific Publishers, 227-265.
- DaMatta F.M. 2004a. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Res.**, 86, 99-114.
- DaMatta F.M. 2004b. Fisiologia do cafeeiro em sistemas arborizados. In: Matsumoto S.N. (Ed.), **Arborização de Cafezais no Brasil**. Salvador: Empresa Gráfica da Bahia, 87-118.
- DaMatta F.M., Loos R.A., Rodrigues R., Barros R.S. 2001. Actual and photosynthetic rates of tropical crop species. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, 13, 24-32.
- DaMatta F. M., Maestri M. 1997. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. **Photosynthetica**, 34, 439-446.
- DaMatta F.M., Maestri M., Mosquim P.R., Barros R.S. 1997. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. **Plant Sci.**, 128, 43-50.

- DaMatta F.M., Rena A.B. 2002. Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno sol. In: Zambolim L. (Ed.), **O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 93-135.
- Demmig-Adams B., Adams W.W.III. 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 W.W., Baker D.H., Logan B.A., Bowling D.R., Verhoeven A.S. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. **Physiol. Plant**, 98, 253-264.
- Elvira R., Alonso S., Castilho J., Gimeno B.S. 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.
- Fahl J.I., Carelli M.L.C., Vega J., Magalhães A.C. 1994. Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). **J. Hort. Sci.**, 69, 161-169.
- Falster D.S., Westoby M. 2003. Leaf size and angle vary widely across species: what consequences for light interception? **New Phytol.**, 158, 509-525.
- Fanjul L., Arreola-R. R., Mendez-C. M.P. 1985. Stomatal responses to environmental variables in shade and sun grown coffee plants in Mexico. **Exp. Agric.**, 21, 249-258.
- Fazuoli L.C. 1986. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena A.B., Malavolta E., Rocha M., Yamada T. (Eds.), **Cultura do Cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 87-114.
- Foyer C.H., Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, 133, 21-25.
- Freitas R.B. **Avaliações ecofisiológicas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) e seringueiras (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) em diferentes sistemas de cultivo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000, 57p. (Tese MS).
- García-Plazaola J.I., Artetxe U., Becerril J.M. 1999. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L) during winter. **Plant Sci.**, 143, 125-133.
- Geigenberger P., Stitt M. 1993. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and in the other plant tissues. **Planta**, 189, 329-339.

- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochim. Biophys. Acta**, 990, 87-92.
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.**, 59, 309-314.
- Gilmore A.M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. **Physiol. Plant.**, 99, 197-209.
- Havir E.A., Mchale N.A. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol.**, 84, 450-455.
- Jackson M.L. 1958. **Soil Chemical Analysis**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 498p.
- James S.A., Bell D.T. 2000. Leaf orientation, light interception and stomatal conductance of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* leaves. **Tree Physiol.**, 20, 815-823.
- Jifon J.L., Syvertsen J.P. 2003. Moderate shade can increase net gas exchange and reduce photoinhibition in citrus leaves. **Tree Physiol.**, 23, 119-127.
- Krause G.H. 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. **Physiol. Plant.**, 74, 566-574.
- Kumar D., Tieszen L.L. 1980. Photosynthesis in *Coffea arabica*. L. Effects of light and temperature. **Exp. Agric.**, 16, 13-19.
- Lambers H., Chapin III F.S., Pons T.L. 1998. **Plant Physiological Ecology**. New York: Springer-Verlag, 539p.
- Landsberg J.J. 1986. **Physiological Ecology of Forest Production**. Orlando: Academic Press, 198p.
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Meth. Enzimol.**, 148, 350-382.
- Lima A.L.S., DaMatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R., Loureiro M.E. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environ. Exp. Bot.**, 47, 239-247.
- Liu L., Xu S.M., Woo K.C. 2003. Influence of leaf angle on photosynthesis and the xanthophyll cycle in the tropical tree species *Acacia crassicarpa*. **Tree Physiol.**, 23, 1255-1261.
- Long S.P., Humphries S., Falkowski P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 45, 633-662.
- Maestri M., Vieira C. 1958. Movimento de estômatos em café, sob condições naturais. **Rev. Ceres**, 59, 324-331.

- Malavolta E. 2000. **História do Café no Brasil: agronomia, agricultura e comercialização**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 456p.
- Malavolta E.P., Fernandes D.R., Casale H., Romero J.P. 1993. Encarte técnico. Seja doutor do seu cafezal. (Ed.), **Arquivo do Agrônomo**. Piracicaba: Potafos, 36p.
- 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.
- Nakano Y., Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.**, 22, 867-880.
- Niyogi K.K. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 50, 333-359.
- Norman J.W., Campbell G.S. 1989. Canopy structure. In: Pearcy R.W., Ehleringer J.R., Mooney H.A., Rundel P.W. (Eds.), **Plant Physiological Ecology: field methods and instrumentation**. London: British Library, 301-323.
- Nunes M.A. 1988. Environmental effects on stomatal and mesophyll regulation of photosynthesis in coffee leaves. **Photosynthetica**, 22, 547-553.
- Ort D.R., Baker N.R. 2002. A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? **Curr. Opin. Plant Biol.**, 5, 193-198.
- Ottander C., Campbell D., Öquist G. 1995. Seasonal changes in photosystem II organization and pigment composition in *Pinus sylvestris*. **Planta**, 197, 176-183.
- Paiva L.C., Guimarães R.J., Souza C.S. 2001. Aspectos fisiológicos de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) formadas a pleno sol. In: Simpósio de Pesquisa de Cafés do Brasil, vol II, 2001, Vitória, ES. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café, p. 11.
- Pearcy R.W. 1989. Radiation and light measurements. In: Pearcy R.W., Ehleringer J.R., Mooney H.A., Rundel P.W. (Eds.), **Plant Physiological Ecology Plant: field methods and instrumentation**. London: British Library, 97-113.
- Pinheiro H.A., DaMatta F.M., Chaves A.R.M., Fontes E.P.B., Loureiro M.E. 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.
- Ramalho J.D.C., Campos P.S., Quartin V.L., Silva M.J., Nunes M.A. 1999. High irradiance impairments on photosynthetic electron transport, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and N assimilation as a function of N availability in *Coffea arabica* L. plants. **J. Plant Physiol.**, 154, 319-326.

- Ramalho J.C., Pons T.L., Groenvelde H.W., Azinheira H.G., Nunes M.A. 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.
- Sharkey T.D., Savitch L.V., Butz N.D. 1991. Photometric method for routine determination of k_{cat} and carbamylation of rubisco. **Photosynth. Res.**, 28, 41-48.
- Silva E.A., DaMatta F.M., Ducatti C., Regazzi A.J., Barros R.S. 2004. Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis in Arabica coffee trees. **Field Crops Res.**, 89, 349-357.
- Soto-Pinto L., Perfecto I., Castillo-Hernandez J., Caballero-Nieto J. 2000. Shade effect on coffee production at the northern Tzeltal zone of the state of Chiapas, Mexico. **Agric. Ecosyst. Environ.**, 80, 61-69.
- Wise R.R., Naylor A.W. 1987. Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. **Plant Physiol.**, 83, 251-259.